Série A, N° 4158
N° d'Ordre : 5009

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

ROGER AUDRAN

1ère THÈSE

"ÉTUDE DE LA PHYSICO-CHIMIE ET DE LA SÉROLOGIE DES GROUPES SÉRIQUES GM"

2ème THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le 20 DEC 1963 devant la Commission d'examen.

MM. L'HÉRITIER, *Président.*
TONNELAT, } *Examinateurs.*
DUBERT, }

Imprimerie Louis HELLENBRAND
4, Rue des Trinitaires — METZ

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41538112_0047

Série A, N° 4158
N° d'Ordre : 5009

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

PAR

ROGER AUDRAN

1ère THÈSE

"ÉTUDE DE LA PHYSICO-CHIMIE ET DE LA SÉROLOGIE DES GROUPES SÉRIQUES GM"

2ème THÈSE

PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

Soutenues le **devant la Commission d'examen.**

MM. L'HÉRITIER, *Président.*
TONNELAT, } *Examinateurs.*
DUBERT, }

Imprimerie Louis HELLENBRAND
4, Rue des Trinitaires — METZ

BIBLIOTHEEK
LEIDEN

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen : M. ZAMANSKY

G. JULIA	T	Analyse supérieure et Algèbre supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et Histologie comparées
GRASSÉ	T	Evolution des êtres organisés
PREVOST	T	Chimie organique
WYART	T	Minéralo. et Cristallo.
TEISSIER	T	Zoologie
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et Relativité
MONNIER	T	Physiologie générale
PIVETEAU	T	Paléontologie
ROCARD	T	Physique (E.N.S.)
CARTAN	T	Mathématiques (E.N.S.)
LAFFITTE	T	Chimie générale
FAVARD	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du Globe.
M[lle] COUSIN	T	Biologie animale (SPCN)
CHRETIEN	T	Chimie minérale
DRACH	T	Zoologie
KASTLER	T	Physique (E.N.S.)
EPHRUSSI	T	Génétique
RIVIERE	T	Géologie SPCN et Sédim.
GAUTHERET	T	Biologie végétale (PCB)
LUCAS R.	T	Recherches Physiques
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire
ARNULF	T	Optique appliquée
MORAND	T	Physique Enseignement
SOLEILLET	T	Physique (P.C.B.)
FORTIER	T	Mécanique Exp. des Fluides
DANJON	T	Astronomie
PETIT	T	Biologie maritime
OUENEY	T	Météorologie et dynamique atmosphérique
GALLIEN	T	Embryologie
EICHHORN	T	Botanique
DE CUGNAC	T	Biologie végétale (SPCN)
M[lle] CAUCHOIS	T	Chimie Physique
THELLIER	T	Physique du Globe
L'HERITIER	T	Biologie générale (Orsay)
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay)
PONCIN	T	Mécanique générale
DUBREIL	T	Arithmétique et Théorie des nombres
OUELET	T	Chimie organique
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire
CUVILLIER	T	Micropaléontologie
JUNG	T	Pétrographie

TRILLAT	T	Microscopie et diffraction électronique
WIEMANN	T	Chimie organique et structure
JACQUINOT	T	Spectroscopie et Physique céleste (Orsay)
VASSY	T	Physique de l'atmosphère
DESTOUCHES	T	Théories physiques
AMIEL	T	Chimie générale
HOCART	T	Minéralogie et Cristallo.
MATHIEU J.-P.	T	Physique Optique
COUTEAUX	T	Biologie animale (P.C.B.)
MAY	T	Zoologie (Orsay)
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et Topologil
FELDMANN	T	Biologie végétale marine
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay)
JOST	T	Physiologie comparée
FORTET	T	Calcul des probabilités et Physique mathématique
SCHARTZ	T	Calcul diff. et intégral
CHOUARD	T	Physiologie végétale
MALAVARD	T	Aviation (Techn. Aéronaut.)
BRELOT	T	Calcul diff. et intégral
NOMRANT	T	Chimie organique
BENARD	T	Chimie minérale
BUVAT	T	Botanique (E.N.S.)
DUGUE	T	Statistiques mathématiques
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie
ULRICH	T	Physiologie végétale
MARECHAL	T	Optique théorique et appliquée
KIRRMANN	T	Théories chimiques
CHADEFAUD	T	Botanique
M[lle] E BRETON	T	Physiologie de la nutrition
SALEM	T	Mathématiques générales
LELONG	T	Application de l'analyse à la géométrie
DEVILLERS	T	Anatomie et Histologie comparées
EHRESMANN	T	Topologie algébrique
FRANÇON	T	Physique (SPCN)
GUANGEAUD	T	Géographie Phys. et Géol. dynamique
GODEMENT	T	Mathématiques (M.P.C.)
PISOT	T	Tech. Mathém. de la Phys.
ROCH	T	Géologie
SCHATZMAN	T	Astrophysique
TERMIER	T	Paléontologie stratig.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales
LENNUIER	T	Physique (M.G.P.)
RIZET	T	Génétique
ROUTHIER	T	Géologie appliquée
M[me] TONNELAT	T	Physique théorique
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.)
SOUCHAY	T	Chimie générale
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale
BRUSSET	T	Chimie systématique
LEVY M.	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay)
M[me] CHAIX	T	Chimie biologique
M[me] HUREL-PY	T	Biologie végétale (P.C.B.)
PIAUX	T	Chimie (M.P.C.)
BRUN	T	Mécanique théorique des fluides
LEDERER	T	Chimie biologique
M[me] DUBREIL	T	Mathématiques (Agrég.)
M[me] LELONG	T	Mathématiques II (E.N.S.)
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.)

COTTE	T	Physique électricité
DUBOIS J.-E.	T	Chimie organique
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.)
MICHEL A.	T	Chimie minérale (Orsay)
OLMER	T	Energétique générale
ROUAULT	T	Electricité (Orsay)
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée
BARCHEWITZ	T	Chimie physique
BROSSEL	T	Physique atomique
BUSER	T	Physiologie comparée
CAMUS	T	Physiologie végétale (BMPV)
CASTAING	T	Physique II Thermod. (Orsay)
CURIEN	T	Minéralo. et Cristallog.
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay)
NOIROT	T	Evolution des Etres org.
PANNETIER	T	Chimie générale
POSSOMBES	T	Zoologie
PULLMANN	T	Chimie quantique
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radio-activité
TONNELAT	T	Biologie physico-chimique
VILLE	T	Econométrie
WILLEMART	T	Chimie (P.C.B.)
DODE	T	Chimie (Orsay)
FREYMANN	T	Recherches physiques
GUINOCHET	T	Biologie végétale (SPNC) (Orsay)
ROLLET	T	Chimie minérale
M[lle] JOSIEN	T	Chimie (S.P.C.N.)
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay)
CHAPELLE	T	Physique (Orsay)
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay)
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay)
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides
LUCAS G.	T	Géologie
ALLARD	T	Chimie physique
BERTHELOT	T	Phys. des particules fondam.
BRICARD	T	Météorologie et Physique de l'atmosphère
M[me] ALBE-FESSARD	T	Psychophysiologie
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay)
JULIA M.	T	Etudes des moléculaires naturelles complexes
LENDER	T	Biologie animale SPNC (Orsay)
MAGAT	T	Physico-Chimie des radio-éléments
M[lle] QUINTIN	T	Electrochimie
MONOD	T	Chimie du métabolisme
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay)
DE POSSEL	T	Analyse numérique
CHARLOT	T	Chimie analytique
LEMEE	T	Physiologie BMPV (Orsay)
GUERIN	T	Chimie MPC (Orsay)
CHATELET M.	T	Chimie PCB
JEAN	T	Physique nucléaire (Orsay)
MATTLER	T	Physique (SPCN)
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay)
BERTEIN	T	Electronique (Orsay)
BOUISSIERES		Chimie des radioéléments (Orsay)
M[me] COUTURE	T	Thermodynamique et Mécanique physique
ELLENBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe.
FRANC	T	Biologie animale (P.C.B.)
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay)

STOLKOWSKI	T	Physiologie végétale
ACHER		Chimie Biol. (Orsay)
BAUDOIN		Biologie animale (P.C.B.)
BEAUMONT		Biologie animale (S.P.C.N.)
BLAMONT	T	Géophysique ionosphère
BOURREAU		Botanique
CURIE D.		Physique (MGP)
DURAND-DELGA	T	Géologie
FREON	T	Chimie organique (Orsay)
HELLER	T	Physiologie végétale
TORTRAT	T	Calcul des probabilités
CAILLEUX		Géologie (SPCN)
MAGNAN	T	Physique (SPCN)
DAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la Chimie théorique et à la Physique nucléaire
M[lle] FOURCROY		Biologie végétale (SPCN)
M[me] CHOQUET-BRUHAT	T	Mécan. analytique et Mécan. céleste
M[lle] VEIL		Physiologie générale
WOLFF	T	Microbiologie
SIESTRUNCK	T	Mécan. Phys. et Expérim.
LACOMBE	T	Métallurg. des métaux
BROCHARD	T	Physique PCB (Orsay)
CABANNES	T	Mécanique générale
LESIEUR	T	MMathématiques I (Orsay)
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay)
CAIRE		Géographie physique et Géologie dynamique
COMOLET	T	Mécanique des fluides
CORABOEUF		Physiologie animale (Orsay)
DELLOUE		Physique de l'exosphère
GORENFLOT		Botanique II (Orsay)
HOUILLON		Biologie animale (PCB)
JULLIEN J.		Chimie SPCN (Orsay)
MALGRANGE	T	Technique mathématique de la physique (Orsay)
OLIVIER		Antropologie
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay)
BLANC-LA-PIERRE	T	Physique ENS (Orsay)
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay)
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay)
SAMUEL	T	Mathématiques ENS féminines
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay)
THIRY	T	Mécanique céleste
ABELES		Physique SPSCN
AMAT		Physique PCB
AUBOIN		Géologie
M[me] BENOIT-GUEUTAL		Physique nucléaire et radioactivité
BOUGIS		Biologie marine (Villefranche-sur-Mer)
BRUHAT	T	Mathématiques MPC
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay)
CHABBAL		Physique MGP (Orsay)
DEHEUVELS	T	Mathématiques Prop. (Orsay)
D'ESPAGNAT		Physique théorique (Orsay)
FURON		Géologie SPCN
M[me] GANS	T	Génétique
GENEVES		Biologie végétale (PCB)
GUILBERT		Physique (CUS Orléans)
HUPE		Pétrographie
HOLLANDE	T	Biologie générale
LIONS	T	Analyse numérique
MAITTE		Chimie (PCB)

MEYER		Physique propédeutique
NICOLAS		Géologie appliquée
PANIGEL		Biologie générale
RAVIER		Pétrographie
ROSEAU	T	Mécanique théorique des fluides
ROUBINE		Electronique
SILBER	T	Chimie P.C.B.
UEBERSFELD	T	Electronique
YVON	T	Théories physiques

Le Secrétaire Général :

R. POULLAIN

A Monsieur TREFOUËL,

Directeur de l'Institut Pasteur

qui, étant mon Parrain de Recherche au Central National de la Recherche Scientifique, m'a toujours témoigné la plus grande bienveillance.

A Monsieur DUJARRIC DE LA RIVIERE,

Sous-Directeur honoraire de l'Institut Pasteur

qui, étant mon Directeur de Recherche au Centre National de la Recherche Scientifique, m'a constamment aidé de ses précieux conseils.

A Monsieur le Professeur WURMSER

qui a dirigé cette étude, j'exprime ma profonde gratitude.

A Madame WURMSER

qui a dirigé la partie relative à l'ultracentrifugation de cette étude, j'adresse mes remerciements.

A Madame STEINBUCH

A Monsieur le Docteur MOULLEC

A Monsieur le Docteur FINE

qui ont mis à ma disposition, au Centre National de Transfusion Sanguine, les moyens nécessaires à cette étude et m'ont aidé de leurs conseils, j'exprime ma reconnaissance.

INTRODUCTION

Alors que l'existence de groupes sanguins, ou plus exactement de groupes érythrocytaires, est connue chez l'homme depuis 1900, c'est récemment que l'on a découvert que les protéines sériques humaines présentaient de véritables groupes sériques, le terme de groupe étant pris dans le sens de possibilité de classement au sein de l'espèce au moyen de différences individuelles constitutionnelles et héréditaires. L'existence de tels groupes est observée dans les trois fractions globuliniques α, β et γ. Parmi les globulines α, ce sont les groupes d'haptoglobine. Parmi les globulines β, ce sont les groupes de transferrine. Parmi les globulines γ, ce sont les groupes Gm, *Gm étant l'abréviation de gamma-globuline.* Les groupes d'haptoglobine et de transferrine sont déterminés à l'aide de méthodes électrophorétiques (électrophorèse en gel d'amidon), alors que les groupes Gm sont déterminés par une méthode sérologique.

Il y a lieu d'évoquer à propos des groupes Gm les travaux d'Oudin sur la spécificité antigénique allotypique des γ-globulines de lapins, c'est-à-dire l'existence de γ-globulines ne se trouvant pas avec la même spécificité antigénique chez tous les individus d'une même espèce animale. Oudin (33) a réussi à immuniser des lapins contre des γ-globulines du sérum d'autres lapins et à faire apparaître en abondance des anticorps précipitants dans le sérum des animaux immunisés. La méthode d'analyse immunochimique par précipitation spécifique en milieu gélifié a permis de distinguer chez le lapin sept allotypes ou familles d'allotypes, dont six ont été bien étudiés. La synthèse de ces six allotypes serait régie par un système génétique. L'allotypie a été observée chez d'autres espèces animales et aussi sur d'autres protéines. C'est ainsi qu'Allison (1) a constaté, en 1961, que le sérum de malades ayant reçu une cinquantaine de transfusions précipitait fortement le sérum de certains sujets normaux. L'anticorps précipitant est une γ 7S et l'antigène est une α_2-globuline. Cet antigène est indépendant des autres systè-

mes de protéines sériques ; il est transmis selon les lois de Mendel et sa fréquence varie dans diverses populations.

Historique des groupes sériques Gm

C'est une réaction d'inhibition de l'agglutination qui a permis à Grubb (18) et Grubb et Laurell (20) de mettre en évidence, parmi les γ-globulines humaines, des différences de groupes. Ces groupes étaient alors conditionnés par la présence ou l'absence d'un facteur désigné par le symbole Gm(a). La mise en évidence de ce facteur est liée à la propriété agglutinante de certains sérums de malades atteints de polyarthrite chronique évolutive (P.C.E.). Ces sérums de P.C.E. ont la faculté d'agglutiner les globules rouges de groupe 0 Rh+ sensibilisés par certains anticorps anti-D incomplets.

Les globules rouges constituent un simple support et la réaction se produit en réalité entre le sérum rhumatoïde et la γ-globuline fixée sur les hématies par la sensibilisation. Environ 50 à 60 p. 100 des sérums humains européens ont la propriété d'inhiber cette agglutination. Ces sérums inhibiteurs possèdent une substance incluse dans le groupe des γ-globulines, appelée Gm(a) et définissant un groupe sérique Gm(a) transmis héréditairement. Les sérums inhibiteurs sont dit Gm(a+), les autres sont dits Gm(a—).

On désigne les sérums de P.C.E. qui sont utilisables pour rechercher les groupes Gm, par le préfixe « anti- », suivi du symbole du facteur sur lequel ils agissent. On dira par exemple sérum anti-Gm(a) pour indiquer la propriété d'un sérum, sans préjuger pour cela de la nature anticorps du facteur agglutinant.

Pour reconnaître le facteur Gm(a), les sérums de P.C.E. sont choisis de telle manière qu'ils agglutinent les globules rouges sensibilisés et que cette réaction soit spécifiquement inhibée par les sérums Gm(a+). Les observations faites par Grubb (19, 21) et par Harboe (24) montrent que l'anticorps anti-D revêtant les globules rouges doit posséder la structure Gm(a). La réaction d'inhibition peut alors s'expliquer par la compétition entre la substance Gm(a) éventuellement présente dans le sérum normal étudié, et celle qui existe à la surface des globules rouges grâce à la présence de l'anticorps fixé. On fait des remarques analogues à propos de la mise en évidence des autres facteurs Gm au moyen des réactifs appropriés.

En 1959, Harboe et Lundeval (23) décrivent le facteur Gm(x), à l'aide d'un système agglutinant formé par un certain sérum de P.C.E. et des globules rouges revêtus d'un anticorps anti-D approprié. Ce facteur Gm(x) semble en rapport avec le facteur Gm(a) : tous les individus Gm(x+) sont nécessairement Gm(a+).

Toujours en 1959, Harboe (22) trouve un sérum donnant des réactions antithétiques avec les sérums anti-Gm(a) : il suppose que ce sérum reconnaît un facteur désigné par le symbole Gm(b) et régi par un gène allèle de celui qui régit le facteur Gm(a).

En Europe, la fréquence des individus Gm(a+) est de 50 à 60 p. 100 ; celle des individus Gm(x+) se situe aux environs de 20 p. et celle des individus Gm(b+) est de l'ordre de 85 à 90 p. 100. Les combinaisons de ces trois facteurs sont les suivantes : Gm(a+x+b+), Gm(a+x+b—), Gm(a+x—b+), Gm(a+x—b—) et Gm(a—x—b+). L'hérédité des facteurs Gm(a), Gm(x) et Gm(b) est actuellement bien démontrée : chaque facteur — considéré isolément — est transmis selon un mode mendélien simple.

Il est nécessaire d'indiquer que jusqu'à ce jour aucune relation entre les groupes Gm, les groupes érythrocytaires et les groupes d'haptoglobine n'a été observée.

Certains sérums de malades (29) ou de sujets normaux (53, 37, 38) présentent, comme les sérums de P.C.E. mentionnés précédemment, la propriété d'agglutiner les globules rouges humains 0 Rh+ sensibilisés par un anticorps anti-D incomplet. Ropartz et coll. (39) ayant remarqué que certains des sérums agglutinants étaient inhibés par des sérums humains, ont montré qu'une telle activité agglutinante pouvait être, dans certains cas, douée d'une activité anti-Gm(a) (40), anti-Gm(x) (41) ou anti-Gm(b) (43). Les groupes sériques Gm, initialement définis par des réactions d'inhibition des facteurs hémagglutinants des sérums de P.C.E., peuvent donc être également déterminés à l'aide de sérums anti-Gm provenant de sujets normaux.

PLAN

La première partie de ce travail consiste en une étude sérologique des groupes sériques du système Gm, où sont envisagés simultanément les facteurs Gm(a), Gm(b) et Gm(x).

Dans le premier chapitre, nous exposons la méthode de détermination des groupes Gm, qui comprend trois phases : l'obtention d'un complexe agglutinable par sensibilisation des hématies 0 Rh+ avec un sérum anti-D convenable, l'agglutination des hématies sensibilisées par un sérum anti-Gm, la recherche de l'inhibition de l'agglutination précédente par le sérum à examiner.

La recherche sytématique des sérums réactifs nécessaires à la détermination des groupes Gm fait l'objet du deuxième chapitre, où sont rapportés les résultats de l'examen de 13.000 sérums de sujets normaux et de 124 sérums anti-D.

Le chapitre III se rapporte à la détermination des groupes sériques dans différentes races humaines comprenant des blancs, des Noirs, des Chinois et des Indiens. La répartition des phénotypes Gm observée chez les blancs est comparée par la méthode statistique à la répartition calculée d'après la théorie génétique admettant l'existence de trois gènes allélomorphes Gm^a, Gm^{ax} et Gm^b. L'influence éventuelle de l'hyper-γ-globulinémie physiologique des Noirs sur leurs caractères Gm est recherchée.

Préalablement à une étude des groupes sériques Gm dans les hypo et les hyper-γ-globulinémies, nous décrivons dans le chapitre IV les méthodes d'estimation des γ-globulines sériques : méthodes basées sur l'électrophorèse de zone et méthode immunologique plus précise basée sur l'inhibition d'un sérum antiglobuline par la γ-globuline humaine.

Dans le chapitre V, nous étudions l'influence des variations importantes du taux des γ-globulines sériques (hypo et hyperglobulinémie pathologique) sur les caractères Gm des sérums.

La deuxième partie de ce travail concerne l'étude physico-chimique des sérums normaux anti-Gm (anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti Gm(x)) et plus particulièrement du support chimique de l'activité anti-Gm.

Dans le chapitre VI sont exposées les méthodes de fractionnement du sérum : méthodes de précipitation chimique, méthodes chromatographiques, méthodes électrophorétiques et immunoélectrophorétique.

Le chapitre VII traite des sérums normaux anti-Gm, de leur fréquence, et de leurs caractéristiques sérologiques et biochimiques.

L'étude physico-chimique de l'activité anti-Gm, qui fait l'objet du chapitre VIII, comporte la localisation biochimique et la purification du support de cette activité.

Les aspects immunologiques de la réaction Gm/anti-Gm font l'objet du dernier chapitre.

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE SÉROLOGIQUE DES GROUPES SÉRIQUES Gm

CHAPITRE PREMIER

MÉTHODE DE DÉTERMINATION DES GROUPES SÉRIQUES Gm

Principe de la réaction

Il consiste dans l'agglutination du « complexe agglutinable » par le sérum anti-Gm (sérum de P.C.E. ou sérum normal) et dans l'essai d'inhibition de cette agglutination par addition de sérum normal.

Le « complexe agglutinable » est constitué par des globules rouges humains de groupe 0 Rhésus positif, revêtus d'anticorps incomplet anti-D, grâce à une sensibilisation préalable au moyen d'un sérum anti-D convenablement choisi. Une suspension globulaire est ainsi préparée et sert à titrer le sérum anti-Gm.

Le test d'inhibition est pratiqué en ajoutant au sérum anti-Gm le sérum normal à tester, dans des conditions bien déterminées de dilution. Deux éventualités peuvent alors se présenter : ou bien le sérum anti-Gm agglutine encore les globules rouges sensibilisés, et le sérum à tester, non inhibiteur, est Gm(—), ou bien le sérum anti-Gm n'agglutine plus les globules rouges sensibilisés, et le sérum à tester, inhibiteur, est Gm(+).

TABLEAU I

LES TROIS PHASES DE L'EXPLORATION DU FACTEUR SÉRIQUE Gm

1. Sensibilisation	Globules rouges O Rh positif + anti-D incomplet	"Complexe agglutinable"
2. Agglutination	Globules rouges sensibilises + sérum anti-Gm	"Complexe agglutinant"
3. Inhibition	Globules rouges sensibilisés + sérum anti-Gm + sérum normal	Agglutination : Gm(—) ou Inhibition : Gm(+)

Ce principe de détermination, dont les trois phases d'exploration sont exposées dans le tableau I, est général, qu'il s'agisse du facteur Gm(a), Gm(b) ou Gm(x) ; seuls varient, avec chaque facteur, les éléments du complexe agglutinant (sérum anti-Gm et sérum anti-D) et l'ajustage réciproque des dilutions.

De nombreux problèmes se posent à propos de cette réaction et nous les envisagerons après avoir exposé les constatations faites en étudiant les différents temps de la réaction.

Nous envisagerons :

— l'obtention du complexe agglutinable ;
— la définition d'un sérum anti-Gm actif sur ce complexe ;
— le phénomène d'inhibition du pouvoir agglutinant du sérum anti-Gm.

Complexe agglutinable

A. — *Les hématies*

Les qualités requises pour les hématies sont les suivantes :

— posséder le facteur D ;
— appartenir au groupe 0 pour éviter d'avoir à se préoccuper d'éventuels anticorps anti-A ou anti-B ;
— enfin, être agglutinables, après sensibilisation, par les sérums anti-Gm choisis.

Nous avons remarqué plusieurs faits :

1) Le phénotype des globules rouges n'est pas indifférent et l'expérience nous a montré que les phénotypes ccDEe, CcDEe et ccDee sont les plus favorables. Nous avons remarqué que l'agglutination la plus nette et le titre le plus élevé étaient donnés par le phénotype CcDEe.

2) Pour un même phénotype, l'individualité du donneur a son importance. En effet, si l'on effectue la réaction avec le même sérum anti-Gm et en employant des hématies de même phénotype Rh provenant d'individus différents, on observe de très sensibles variations dans les résultats obtenus. Ce phénomène, qui ne reçoit pas d'explication valable, entraîne l'obligation de toujours disposer du sang du même individu pour étudier les facteurs Gm sur une série de sérums. Pour éviter des prélèvements répétés sur le même donneurs, nous avons utilisé le procédé de conservation des hématies. Ce sont les hématies d'un même donneur Mas... qui nous ont servi au cours de toutes nos expériences.

3) La conservation des hématies est réalisée à — 20° C, en milieu citrate-phosphate glycérolé à 40 %, selon la technique de Tullis et coll. (52). Le sang ayant été recueilli sur solution ACD *

et aussitôt centrifugé, un volume de culot globulaire est mélangé à un égal volume de solution citrate-phosphate glycérolée à 40 % préparée selon la formule suivante :

— Citrate trisodique (5,5 H_2O) ..... 4,29 g
— Phosphate monopotassique ..... 0,55 g
— Phosphate disodique (12 H_2O) ..... 1,43 g

à dissoudre dans 120 ml d'eau stérile.
Ajouter à cette solution 80 ml de glycérol.

Afin d'éviter la légère hémolyse que peut produire le contact direct des hématies avec la solution glycérolée à 40 %, nous opérons en deux temps : au volume de culot globulaire est ajouté, dans un premier temps, un demi volume de solution citrate-phosphate glycérolée à 20 %, dans un deuxième temps, un demi-volume de solution citrate-phosphate glycérolée à 60 %.

Les hématies ainsi traitées sont réparties en tubes sous un faible volume (2 ml représentant 1 ml de culot globulaire) et congelées à — 20° C.

Pour leur utilisation quotidienne, les hématies sont réchauffées au Bain-Marie à 37° C et mises successivement en contact avec des solutions de citrate trisodique à 3,3 p. 100 contenant respectivement 16 p. 100, 8 p. 100, 4 p. 100, et 2 p. 100 de glycérol, les temps de contact de 15 minutes étant suivis d'une centrifugation et d'une décantation avant de passer à la solution de concentration inférieure en glycérol. Les hématies sont enfin lavées deux fois à l'eau physiologique.

Après plusieurs mois de conservation en milieu glycérolé à basse température, les hématies sont toujours capables, après sensibilisation, d'être agglutinées par les sérums anti-Gm avec les mêmes caractéristiques qu'à l'état frais.

B. — *Le sérum anti-D*

Le globule rouge dans ce type de réaction n'est qu'un « indicateur » ; il sert de support à la γ-globuline anti-D qui va fixer le facteur agglutinant du sérum anti-Gm.

Les qualités requises pour le sérum anti-D sont les suivantes :

— il doit toujours appartenir au groupe Gm que l'on cherche à détecter. C'est ainsi que pour tester des individus au point de vue du facteur Gm(a), l'on devra s'adresser à des sérums anti-D nécessairement Gm(a+) qui pourront donc posséder les phénotypes suivants : Gm(a+b+x+), Gm(a+b+x—), Gm(a+b—x—),

---

* La formule de la solution ACD est la suivante :
— Acide citrique (1 H^2O) ..... 1.66 g
— Soude ..... 0,60 g
— Glucose anhydre ..... 3 g
— Eau distillée : Q.S. pour 100 cm^3.

Gm(a+b—x+). De même, pour rechercher le facteur Gm(x), l'anti-D choisi ne pourra appartenir qu'aux deux phénotypes suivants :Gm(a+b+x+), Gm(a+b—x+). Enfin, lors de la recherche du facteur Gm(b), l'anti-D devra nécessairement appartenir à l'un des trois phénotypes Gm(a+b+x+), Gm(a+b+x—), Gm (a—b+x—) ;

— il doit avoir un titre élevé en réaction de Coombs, au moins 1/128.

Les sérums anti-D que nous utilisons sont :

a) pour la recherche du facteur Gm(a) : l'anti-D Cha... de phénotype Gm(a+b—x—) ;

b) pour la recherche du facteur Gm(b) : l'anti-D Lab... de phénotype Gm(a—b+x—) ;

c) pour la recherche du facteur Gm(x) : l'anti-D Bau... de phénotype Gm(a+b—x+).

Ces trois sérums, dont le titre est supérieur à 1/128, ont été examinés par Harboe d'une part, par Ropartz d'autre part, qui les ont testés avec des sérums anti-Gm de référence de Grubb et de Harboe. Chacun de ces sérums anti-D a été reconnu propre à la détermination du facteur anti-Gm indiqué plus haut.

Ces sérums anti-D, conservés à — 20° C, gardent leurs propriétés pendant plusieurs années.

C. — *La sensibilisation*

Son exécution est simple et classique : c'est le premier temps de la réaction de Coombs.

Trois facteurs interviennent dans la sensibilisation :

— l'état de conservation des hématies employées ;

— la proportion des globules rouges et du sérum anti-D ;

— le temps et la température de contact entre les hématies et le sérum anti-D.

Les hématies de groupe 0 et de phénotype CcDEe du donneur Mas.., décongelées quotidiennement et débarrassées de glycérol par lavages successifs, présentent les mêmes propriétés antigéniques qu'à l'état frais.

Nous avons effectué pour les trois sérums anti-D couramment utilisés une étude systématique de la sensibilisation en fonction :

a) du rapport de sensibilisation R (volume de sérum anti-D/ volume de culot globulaire) et de la dilution du sérum anti-D ;

b) de la température et de la durée d'incubation des hématies avec l'anti-D.

La valeur de la sensibilisation était appréciée par le titre et l'intensité de l'agglutination que donnaient les hématies sensibilisées

par chacun des anti-D avec le sérum anti-Gm correspondant. Nous avons utilisé parallèlement des sérums de P.C.E. et des sérums normaux anti-Gm.

Il n'existe, en effet, aucune méthode concrète pour mesurer la quantité d'anti-D fixée sur les hématies. D'autre part, la réaction d'agglutination avec le sérum antiglobuline humaine n'est nullement parallèle à l'agglutination obtenue avec le sérum anti-Gm.

Nous avons obtenu les résultats suivants :

a) Le volume minimum de sérum anti-D donnant la sensibilisation optima était, pour un volume de culot globulaire, de :

— 3 vol. d'anti-D Cha..., R = 3

— 3 vol. d'anti-D Lab..., R = 3

— 7 vol. d'anti-D Bau..., R = 7.

Les essais comparatifs effectués en diluant le volume de sérum anti-D par addition d'eau physiologique ne nous ont pas donné de résultats supérieurs à l'utilisation de l'anti-D pur.

b) Les températures de sensibilisation adoptées étant de 20° C, 37° C., 45° C et 56° C, et les globules étant « testés » toutes les cinq minutes jusqu'à 15 mn, toutes les quinze minutes jusqu'à 2 heures, nous avons constaté que la sensibilisation maxima était obtenue soit après 30 mn à 37° C, soit après 15 mn à 45° C. Elle apparaissait après plus d'une heure à 20° C. A 56° C, après un début de sensibilisation, l'hémolyse des hématies apparaissait dès la dixième minute.

Nous avons adopté pour nos sensibilisations les rapports de sensibilisation optima indiqués plus haut, sans dilution de l'anti-D, et la durée d'incubation de 15 mn à 45° C.

L'agglutination par les sérums anti-Gm

A. — *Le phénomène*

Sur une plaque d'opaline, on dépose une goutte de chaque dilution (1/2, 1/4.., 1/1024) du sérum anti-Gm, que l'on mélange avec une goutte de suspension globulaire sensibilisée par le sérum anti-D spécifique du facteur Gm recherché. L'opération se fait, à la température du laboratoire, en imprimant à la plaque un mouvement circulaire doux et régulier. Au bout de quelques minutes, et progressivement, apparaît une agglutination classique faite de petits grains répartis au centre de la goutte. Cette agglutination est très nette dans les premières dilutions, moins nette dans les dernières. Les titres habituellement observés sont 1/128 au minimum pour les sérums de P.C.E., 1/32 pour les sérums normaux présentant un anti-Gm *(Tableau 1 bis)*.

TABLEAU I bis

TITRE D'UN SERUM ANTI-Gm SUIVANT SON ORIGINE

	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	1/1024	1/2048
Sérum Leb.. (PCE anti-Gm(a)	+++	+++	+++	+++	+++	++	+ +	+	—	—	—
Sérum Ste . . (normal anti-Gm(a)	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—	—	—

Pour éviter la dessication des gouttes lorsque l'agglutination est lente à apparaître, nous utilisons une chambre humide. Il nous a paru utile de vérifier l'influence de différents facteurs sur cette réaction :

— Technique : cette réaction, que nous effectuons sur plaque, peut être également réalisée en tube ;

— Milieu : les dilutions de sérum et la suspension d'hématies sensibilisées sont faites en soluté physiologique à 9 p. 1000 de ClNa, sans qu'il soit nécessaire de tamponner, comme nous l'a montré l'expérimentation suivante.

Nous avons réalisé la réaction d'agglutination à différents pH, en tamponnant les réactifs à l'aide de tampon véronal-véronal sodé ; le titre du sérum anti-Gm ne variait pas entre les pH 6, 5 et 9. A ces pH extrêmes, l'intensité de l'agglutination était diminuée par suite d'une hémolyse partielle des hématies. En dehors de cet intervalle de pH, l'hémolyse rendait impossible la lecture d'une agglutination.

— Lecture : elle se fait à l'œil nu.

— Concentration des globules sensibilisés : elle est faible ; la concentration de 0,5 p. 100 semble être optima.

— Température : l'agglutination se produit indifféremment à 20° C ou à 37° C.

B. — *Pouvoir agglutinant de différents sérums anti-Gm*

Certains sérums de P.C.E. possèdent un facteur capable d'agglutiner les hématies sensibilisées par un anti-D incomplet.

Les sérums doués de cette propriété présentent tous une réaction de Waaler-Rose positive. Les sérums de P.C.E. ainsi sélectionnés doivent répondre à d'autres exigences. Il importe qu'ils possèdent un titre élevé en facteur agglutinant, qu'ils ne présentent pas de

phénomène de zone et qu'ils puissent être inhibés par l'adjonction de γ-globulines humaines.

Très peu de sérums de P.C.E. pourront être retenus ; en effet, nous verrons ci-dessous que bien des complexes agglutinants de « bonne qualité » en ce qui concerne la réaction d'agglutination s'avèrent être de « mauvais réactifs » lorsqu'on tente de les inhiber par les sérums normaux Gm(+). Parmi les sérums agglutinants provenant soit de P.C.E., soit de sujets normaux, un certain nombre donnent des réactions d'agglutination qui ne sont inhibées par aucun sérum normal.

En définitive, lors de la réaction d'inhibition, seuls certains complexes agglutinants, que nous désignerons désormais par le symbole anti-Gm/anti-D, donnent des réactions d'inhibition nettes, permettant la détermination d'un des trois types de facteurs Gm.

Les sérums anti-Gm que nous avons utilisés pour effectuer la détermination des trois groupes Gm proviennent de sujets normaux et sont :

a) pour le groupe Gm(a) : le sérum Ste..., anti-Gm(a), titrant 1/32 ;

b) pour le groupe Gm(b) : le sérum Che..., anti-Gm(b), titrant 1/16 ;

c) pour le groupe Gm(x) : le sérum Chr..., anti-Gm(x), titrant 1/32.

La propriété agglutinante présentée par certains sérums de P.C.E. est due à des protéines. On sait, depuis les travaux de Kunkel (26), qu'il s'agit de macromolécules ayant la solubilité des euglobulines, existant sous la forme de complexes d'indice de sédimentation 22S, dissociables par l'urée en deux constituants, 7S et 19S. C'est ce constituant 19S qui possède l'activité. Ces protéines, de poids moléculaire élevé (10^6), riches en hydrates de carbone (10 p. 100), peuvent être dissociées par le mercaptoéthanol avec perte de l'activité sérologique. Elles migrent en immunoélectrophorèse avec les β_2-Macroglobulines.

La propriété anti-Gm présente dans certains sérums normaux (et dont nous étudions la nature biochimique dans la deuxième partie de ce travail) s'est révélée présenter une localisation analogue à celle du facteur agglutinant des sérums de P.C.E.

La réaction d'inhibition

A. — *Principe.*

L'agglutination du complexe défini plus haut peut être inhibée par l'addition de certains sérums normaux, ceux du groupe Gm(+),

les sérums non inhibiteurs étant par définition du groupe Gm(—).

Le complexe agglutinant anti-Gm/anti-D, spécifique du Gm(a), par exemple, sera inhibé par les sérums Gm(a+). Le même raisonnement est applicable aux complexes agglutinants spécifiques du Gm(b) d'une part, du Gm(x) d'autre part, qui seront inhibés respectivement par les sérums Gm(b+) et Gm(x+).

Le facteur inhibiteur, comme l'a montré Grubb (18) pour le Gm(a), est isolable dans la fraction des γ-globulines et possède un indice de sédimentation de 7S.

La protéine des sérums anti-Gm qui est responsable de l'agglutination reconnaît :

— d'une part, l'anti-D Gm(+) fixé sur les hématies ;

— d'autre part, le facteur Gm(+) que nous explorons.

La réaction d'inhibition s'explique par la compétition entre la substance Gm(+) éventuellement présente dans le sérum normal étudié, et celle qui se trouve à la surface des hématies, grâce à la présence de l'anticorps fixé.

B. — *Technique*

La technique d'inhibition diffère suivant que le sérum anti-Gm provient d'un P.C.E. ou d'un sujet normal.

a) Sérum anti-Gm de P.C.E.

Les dilutions des sérums antagonistes, sérum de P.C.E. et sérum à tester, doivent être mutuellement ajustées. Le sérum de P.C.E. est dilué de façon qu'il contienne de 10 à 20 doses agglutinantes. Pour déterminer la dilution optima de chaque sérum, nous cherchons la dilution produisant l'agglutination et l'inhibition la plus nette avec les témoins connus Gm(+) et Gm(—), eux-mêmes dilués à 1/4, 1/16, 1/32.

Nous prendrons l'exemple du sérum Leb.., sérum de P.C.E. anti-Gm(a), agglutinant les hématies sensibilisées par l'anti-D Cha... (propre à la recherche du facteur Gm(a)), jusqu'à la dilution 1/256.

Une goutte de chacune des dilutions 1/4, 1/8, ..., 1/128 du sérum à tester est mise en présence sur plaque, pendant une durée de cinq à dix minutes, d'une goutte de dilution à 1/20 du sérum Leb... Une goutte de suspension à 0,5 p. 100 d'hématies sensibilisées par l'anti-D Cha... est alors ajoutée.

La lecture se fait après quelques minutes en agitant légèrement la plaque à la main. Les résultats obtenus en « testant » trois sérums Gm(a+) et trois sérums Gm(a—) sont indiqués dans le tableau II.

TABLEAU II

INHIBITION DU SÉRUM LEB... DILUÉ A 1/20
PAR DES SÉRUMS Gm(a+) ET Gm(a−)

Sérum normal	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
N° 1 Gm(a+)	—	—	—	—	+	++
N° 2 Gm(a+)	—	—	—	—	+	++
N° 3 Gm(a+)	—	—	—	—	+	++
N° 4 Gm(a—)	—	+	++	++	++	++
N° 5 Gm(a—)	—	+	++	++	++	++
N° 6 Gm(a—)	—	+	++	++	++	++

La différence entre les sérums Gm(+) et Gm(—) est plus quantitative que qualitative, puisque la substance inhibitrice peut être mise en évidence en petite quantité dans les sérums Gm(—), la capacité d'inhibition des sérums Gm(+) étant environ dix fois plus forte que celle des sérums Gm(—).

b) Sérums normaux présentant un anti-Gm.

La technique d'inhibition par les sérums à tester est différente de ce qu'elle était précédemment : le sérum anti-Gm (anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x)), titrant approximativement 1/32, est employé pur, non dilué. Le sérum à tester est aussi employé pur. L'inhibition, quand elle existe, est très nette, parfaitement lisible : le facteur agglutinant est neutralisé par le sérum inhibant dilué à 1/128 dans le cas des Gm(a+) et Gm(x+), à 1/32 dans le cas des Gm(b+), comme le montre le tableau III. Les sérums Gm(a—), Gm(b—), Gm(x—), même employés purs, n'inhibent pas le facteur anti-Gm correspondant. Les sérums Ste... (anti-Gm(a)), Che... (anti-Gm(b)), Chr... (anti-Gm(x)), dont nous indiquons les caractéristiques de l'inhibition dans le tableau III, sont ceux qui ont été utilisés pour nos déterminations de groupes Gm.

TABLEAU III

CARACTÉRISTIQUES DE L'INHIBITION DES TROIS TYPES D'ANTI-Gm PAR LES SÉRUMS Gm(+) ET Gm(−) CORRESPONDANTS

		1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
anti-Gm(a) Ste...	Sérum Gm(a +)	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	Sérum Gm(a —)	++	++	++	++	++	++	++	++	++
anti-Gm(b) Che...	Sérum Gm(b +)	—	—	—	—	—	—	+	++	++
	Sérum Gm(b —)	++	++	++	++	++	++	++	++	++
anti-Gm(x) Chr...	Sérum Gm(x +)	—	—	—	—	—	—	—	—	+
	Sérum Gm(x —)	+	+	++	++	++	++	++	++	++

De même que la réaction d'agglutination proprement dite, la réaction d'inhibition est indépendante du pH entre pH 6,5 et pH 9 ; la température ne joue aucun rôle entre 20° C et 37° C. La réaction, que nous effectuons sur plaque, peut aussi être réalisée en tube ou par les deux méthodes combinées (contact en tube, réaction sur plaque). La concentration de la suspension globulaire doit être faible (0,5 %).

Le temps de contact entre le sérum anti-Gm et le sérum à tester, qui est toujours inférieur à 30 minutes, ne nous a pas paru jouer de rôle dans l'appréciation de l'inhibition.

C. — *Réactions témoins.*

Pour que les réactions d'agglutination ou d'inhibition obtenues soient interprétables et pour affirmer que le facteur Gm(+) ou Gm(—) est responsable de la réaction obtenue, il est nécessaire de pratiquer les réactions témoins suivantes :

— eau physiologique + globules rouges sensibilisés, pour s'assurer que les globules sensibilisés n'agglutinent pas spontanément en eau physiologique ;

— sérum anti-Gm + globules sensibilisés par l'anti-D correspondant, pour s'assurer de la valeur du complexe agglutinant spécifique ;

— sérum à examiner + globules rouges sensibilisés, pour s'assurer que ce sérum n'a pas lui-même un pouvoir agglutinant vis-à-vis des globules rouges sensibilisés par un des trois sérums anti-D.

Un tel pouvoir agglutinant masque, en effet, un pouvoir inhibiteur éventuel du sérum et doit nécessairement être détruit préalablement à la recherche du pouvoir inhibiteur.

On le fait disparaître soit par absorption à l'aide des globules sensibilisés agglutinés, soit par chauffage à 63° C pendant 10 minutes du sérum dilué au 1/2, le pouvoir inhibiteur étant en effet respecté par un tel chauffage.

Enfin, il faut « tester » parallèlement des sérums normaux connus Gm(+) ou Gm(—).

En conclusion, un certain nombre de conditions sont à respecter pour la détermination des facteurs Gm :

— le type des globules rouges,
— le titre et la qualité de l'anti-D,
— la qualité de l'anti-Gm,
— la dilution des sérums à tester.

Ces conditions étant respectées, les résultats obtenus sont clairement interprétables. Nous soulignerons l'intérêt des sérums anti-Gm provenant de sujets sains, que nous employons et qui évitent d'utiliser des dilutions successives du sérum à tester et facilitent le groupage des facteurs Gm sur un grand nombre de sujets.

CHAPITRE II

RECHERCHE SYSTÉMATIQUE DES SÉRUMS RÉACTIFS NÉCESSAIRES A LA DÉTERMINATION DES GROUPES SÉRIQUES Gm

Nous avons appliqué la méthode exposée au chapitre précédent à la détermination des groupes sériques chez l'homme, détermination qui constitue le but de la partie sérologique de ce travail. Avant d'en arriver à cet exposé statistique, nous devons mentionner les résultats d'une recherche systématique des sérums réactifs nécessaires à la détermination des groupes sériques Gm.

Cette recherche systématique des éléments du complexe agglutinant, c'est-à-dire des sérums anti-Gm et des anti-D correspondants, présente un double intérêt :

a) Intérêt théorique. La fréquence et les caractéristiques des sérums réactifs détectés sont susceptibles d'apporter ou de confirmer des notions sur le mécanisme fondamental des réactions permettant de définir les groupes sériques Gm.

b) Intérêt pratique. Avant d'entreprendre des déterminations en série, nous devions disposer de quantités importantes de réactifs, provenant de plusieurs sujets, afin d'être à même de procéder à un choix parmi ces réactifs en fonction de leurs valeurs respectives.

Nous avons examiné d'une part des sérums de P.C.E. et des sérums de sujets normaux en vue d'y déceler une des trois activités anti-Gm, d'autre part des sérums anti-D avec lesquels nous sensibilisions des hématies qui étaient testées par chacun des trois types de sérums anti-Gm.

La première opération, consistant à déceler les sérums anti-Gm, nécessite la possession des sérums anti-D spécifiquement agglutinés par chacun des anti-Gm, ainsi que la possession de sérums de groupes Gm préalablement connus, afin de s'assurer de l'inhibition spécifique de l'agglutination par les sérums Gm(+), et de sa non-inhibition par les sérums Gm(—). Réciproquement, la deuxième opération, consistant à déceler les sérums anti-D convenables, nécessite la possession de chacun des trois sérums anti-Gm spécifiques et des témoins Gm(+) et Gm(—).

Préalablement au double dépistage entrepris, il nous était nécessaire d'avoir des réactifs (sérums anti-Gm et sérums anti-D) de référence et des sérums témoins de Gm indiscutablement établis.

A) Sérums réactifs de référence

Nous avions à notre disposition :

a) *des sérums anti-Gm de référence :*

— un sérum anti-Gm(a), le sérum Bou... ;

— un sérum anti-Gm(x), le sérum Ten... ;

Ces sérums, titrant chacun 1/32, étaient les deux premiers sérums anti-Gm provenant de sujets normaux décrits et nous avaient été procurés par Ropartz, qui les avait détectés et authentifiés (39, 40, 41) à l'aide des sérums témoins de Grubb et de Harboe.

b) *des sérums anti-D de référence :*

— l'anti-D Cha..., propre à la recherche du facteur Gm(a) ;

— l'anti-D Lab..., propre à la recherche du facteur Gm(b) ;

— l'anti-D Bau..., propre à la recherche du facteur Gm(x).

Ces sérums anti-D provenaient de donneurs du Centre National de Transfusion Sanguine volontairement immunisés contre le facteur D. Ils avaient été examinés, d'une part par Harboe, d'autre part par Ropartz, qui avaient constaté leur agglutination respective par leurs sérums anti-Gm de référence et leur inhibition spécifique à l'aide de leurs sérums témoins Gm(+) et Gm(—).

c) *un lot de 50 sérums témoins*, de Gm(a), Gm(b) et Gm(x) connus, destinés à constituer un lot de référence dont la validité avait été établie par les spécialistes internationaux du Gm réunis le 9 avril 1960 à Rouen en « Journées d'Etudes sur les groupes Gm ».

B. Détection des sérums anti-Gm

Cette recherche a porté sur 100 sérums de P.C.E. et sur 13.000 sérums de sujets normaux (donneurs de sang du Centre National de Transfusion Sanguine).

a) *Technique de recherche.*

Le pouvoir agglutinant était recherché sur les sérums de P.C.E. dilués à 1/10, 1/20, 1/40 (en raison des phénomènes de zone) et sur les sérums normaux purs, à l'aide des hématies de groupe 0 CcDEe sensibilisées selon la technique indiquée au chapitre I par chacun des trois sérums anti-D de référence :

— l'anti-D Cha..., pour la recherche de l'agglutination anti-Gm(a) ;

— l'anti-D Lab..., pour la recherche de l'agglutination anti-Gm(b) ;

— l'anti-D Bau..., pour la recherche de l'agglutination anti-Gm(x).

Lorsqu'un sérum « testé » présentait un pouvoir agglutinant sur les globules sensibilisés par un des anti-D précédents, nous examinions l'action de sérums témoins Gm(+) et Gm(—) correspondants sur cette agglutination, c'est ainsi qu'un sérum agglutinant les globules sensibilisés par l'anti-D Cha... était mis en contact sur lame, selon la technique d'inhibition exposée au chapitre I, avec 30 sérums Gm(a+) et 30 sérums Gm(a—), successivement dilués ou purs (suivant que le sérum agglutinant provenait d'un P.C.E. ou d'un sujet normal).

Si cette agglutination était inhibée par tous les sérums Gm(a+) et ne l'était pas par tous les sérums Gm(a—), le sérum présentant ce pouvoir agglutinant était considéré comme un sérum anti-Gm(a) spécifique. De même, un sérum agglutinant l'anti-D Lab... était testé avec des sérums témoins Gm(b+) et Gm(b—), un sérum agglutinant l'anti-D Bau..., avec des sérums témoins Gm(x+) et Gm(x—), afin d'établir l'inhibition spécifique de l'agglutination observée.

b) *Résultats.*

Les résultats sont exposés dans le tableau I :

TABLEAU I

RÉSULTATS DES DÉTECTIONS DE SÉRUMS ANTI-Gm

	Nombre de sérums examinés	Anti-Gm(a)	Anti-Gm(b)	Anti-Gm(x)
Sérums de P. C. E.	100	3	3	1
Sérums normaux	13.000	18	9	2

Les groupes Gm des sérums normaux anti-Gm ont été déterminés après avoir fait disparaître leur pouvoir agglutinant soit par absorption à l'aide de globules sensibilisés, soit par chauffage à 63° C du sérum dilué à 1/2, les facteurs Gm n'étant pas détruits à cette température.

Il est important du point de vue théorique de remarquer que les sérums normaux anti-Gm trouvés ne présentaient pas dans leur phénotype le facteur Gm qu'ils servaient à détecter.

C'est ainsi que les sérums anti-Gm(a) étaient de groupe Gm(a—), les sérums anti-Gm(b) de groupe Gm(b—), et les sérums anti-Gm(x) de groupe Gm(x—). Cette constatation est à rapprocher de la réaction antigène-anticorps où l'organisme ne produit pas d'anticorps dirigés contre les antigènes présents dans son sérum.

C. Détection des sérums anti-D

Nous avons examiné 124 sérums anti-D provenant soit de femmes iso-immunisées par une grossesse, soit d'hommes volontairement immunisés contre le facteur D. Ces sérums avaient été préparés par le Centre National de Transfusion Sanguine, le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Paris, ou le Centre Régional de Transfusion Sanguine de Nantes ; leurs titres étaient au moins de 1/128 en réaction de Coombs.

c) *Technique.*

Chacun de ces anti-D servait à sensibiliser des globules rouges, à raison de 10 volumes de sérum anti-D pour 1 volume de culot globulaire, selon les conditions techniques de sensibilisation exposées au chapitre I. Les globules sensibilisés par chacun des sérums anti-D étaient « testés » avec chacun des sérums anti-Gm :

— le sérum Ste..., anti-Gm(a) ;
— le sérum Che..., anti-Gm(b) ;
— le sérum Chr..., anti-Gm(x).

Lorsqu'une agglutination était rencontrée, avec le sérum Ste... anti-Gm(a) par exemple, son inhibition spécifique était recherchée à l'aide de sérums témoins Gm(a+) et Gm(a—). Si tous les sérums Gm(a+) étaient inhibiteurs, et tous les sérums Gm(a—) non inhibiteurs, l'anti-D ayant servi à sensibiliser les globules était considéré comme valable pour la recherche du facteur Gm(a).

La même étude était faite à l'aide de sérums témoins Gm(b+), Gm(b—), Gm(x+) et Gm(x—) quand les globules sensibilisés par l'anti-D avaient été agglutinés par le sérum anti-Gm(b) ou anti-Gm(x).

b) *Résultats.*

Sur les 124 sérums anti-D examinés :

— 19 conviennent pour la recherche du facteur Gm(a) ;
— 10 conviennent pour la recherche du facteur Gm(b) ;
— 9 conviennent pour la recherche du facteur Gm(x).

Chacun de ces anti-D possède le facteur Gm qu'il sert à détecter, conformément à ce qu'avait remarqué Grubb (19).

Il résulte de cette recherche systématique que :

a) Les sérums anti-D propres à la recherche d'un des facteurs Gm sont relativement fréquents (environ 30 %) parmi les sérums anti-D de titre égal ou supérieur à 1/128 en réaction de Coombs. Cette étude nous montre cependant qu'un titre élevé et la possession du facteur Gm recherché ne sont pas suffisants pour qu'un anti-D soit propre à former un complexe agglutinant avec un sérum anti-Gm.

Si les deux conditions précédentes étaient suffisantes, étant donné qu'il existe 50 p. 100 de sérum Gm(a+), nous aurions dû trouver près de 60 sérums anti-D sur les 124 examinés ; or nous n'en trouvons que 19. Il existe donc une troisième condition, que nous ne connaissons pas et qui est peut-être l'aptitude d'un sérum anti-D à se fixer sur les globules, c'est-à-dire la quantité de sérum anti-D que les globules peuvent fixer, quantité que nous n'avons pas la possibilité de mesurer. Ce problème pourrait être résolu en rendant le sérum anti-D fluorescent, ou en marquant par I^{131} les γ-globulines de ce sérum.

b) Les sérums anti-Gm sont relativement rares parmi les sérums de P.C.E. et encore plus rares parmi les sérums normaux. Si nous cherchons, à l'aide de la statistique précédente, à connaître ce qui conditionne la présence d'un facteur anti-Gm dans un sérum, nous devons distinguer les sérums de P.C.E. des sérums normaux.

Pour les premiers, nous avons vérifié que tous les sérums de P.C.E. anti-Gm présentaient une réaction de Waaler-Rose positive et possédaient donc le Facteur Rhumatoïde, sans que la réciproque soit vraie. Pour les sérums normaux présentant un pouvoir anti-Gm, nous avons, dans la deuxième partie de ce travail, effectué une étude clinique et sérologique des sujets dont provenaient ces sérums, qui nous a montré que ces sujets étaient normaux ou, du moins, apparemment normaux.

CHAPITRE III

DÉTERMINATION DES GROUPES SÉRIQUES Gm DANS DIFFÉRENTES RACES HUMAINES

Une variation de la répartition du groupe Gm(a) suivant la population envisagée ayant été mise en évidence par les travaux de Grubb (19), Steinberg (49) et Ropartz (42), nous avons procédé à la détermination des groupes sériques Gm(a), Gm(b) et Gm(x) dans différentes races. Nous avons examiné des sujets de race blanche (de la région parisienne), des sujets de race jaune (Chinois de Macao), des sujets de race noire (Noirs de Dakar), et des Indiens (de la Guyane).

La méthode de détermination des groupes sériques ayant été exposée dans son ensemble au chapitre I, nous indiquerons sommairement la succession des différents temps de la technique de détermination.

Technique sommaire de détermination

— Complexes agglutinants : trois complexes agglutinants, dont les sérums anti-Gm sont des sérums normaux, sont utilisés pour la détermination des trois facteurs Gm :

Le complexe sérum Ste.../anti-D Cha... pour le facteur Gm(a).

Le complexe sérum Che.../anti-D Lab... pour le facteur Gm(b).

Le complexe sérum Chr.../anti-D Bau... pour le facteur Gm(x).

— Sensibilisation des hématies. Un volume de culot des globules du donneur Mas..., conservés congelés à — 20°C en milieu citrate-phosphate glycérolé à 40 %, est, après lavage, sensibilisé par un volume de sérum anti-D variant selon l'anti-D.

3 vol. d'anti-D Cha...
3 vol. d'anti-D Lab...
7 vol. d'anti-D Bau...

Après 15 minutes au bain-marie à 45° C, les globules sont lavés trois fois par du soluté physiologique et mis en suspension à 0,5 p. 100 dans ce soluté.

— Dilution des sérums. Les sérums anti-Gm, ainsi que les sérums à « tester », sont utilisés non dilués.

— Réaction proprement dite. La réaction est effectuée sur plaque d'opaline à la température du laboratoire. Une goutte du sérum à examiner, en facteur Gm(a) par exemple, est ajoutée à une goutte de sérum anti-Gm(a) Ste...; après un temps de contact de 5 à 10 minutes, une goutte de suspension de globules sensibilisés par l'anti-D Cha... est ajoutée. La plaque est agitée manuellement et la lecture est effectuée quelques minutes après. Une inhibition de l'agglutination

traduit un sérum Gm(a+). La même opération est effectuée pour la recherche du facteur Gm(b) ou du facteur Gm(x), en utilisant le complexe agglutinant correspondant.

— Témoins. Les réactions témoins suivantes sont pratiquées :
eau physiologique + globules rouges sensibilisés,
sérum anti-Gm + globules rouges sensibilisés,
sérum à examiner + globules rouges sensibilisés,
témoins Gm(+) et témoins Gm(—).

Lorsque le sérum à examiner est lui-même agglutinant vis-à-vis des globules sensibilisés, ce qui est révélé par le troisième témoin, on doit faire disparaître ce pouvoir agglutinant préalablement à la recherche du pouvoir inhibiteur. Pour la suppression de ce pouvoir agglutinant, nous employons l'un des procédés suivants : chauffage à 63°C ou absorption (voir chapitre I).

Résultats des déterminations

1) *Répartition des facteurs Gm.*

Cette répartition dans les différentes populations examinées est rapportée dans le tableau I.

TABLEAU I

RÉPARTITION DES FACTEURS Gm DANS DIFFÉRENTES POPULATIONS

	Gm(a)			Gm(b)			Gm(x)		
	Examinés	Gm(a +)		Examinés	Gm(b +)		Examinés	Gm(x +)	
		Nombre	p. 100		Nombre	p. 100		Nombre	p. 100
BLANCS (région parisienne)	705	358	50,8	705	639	91,10	705	117	16,60
NOIRS (de Dakar)	400	400	100	400	400	100	400	0	0
CHINOIS (de Macao)	250	250	100	250	237	94,8	250	27	10,8
INDIENS (Oulouyennes de la Guyane)	100	100	100	100	44	44	100	9	9

La variabilité de la fréquence des facteurs Gm suivant la population envisagée indique qu'elle constitue un apport valable pour la caractérisation des différentes populations humaines.

— La fréquence du facteur Gm(a), qui est d'environ 50 p. 100 dans les populations blanches, est de 100 p. 100 dans les autres populations.

— Chez les Noirs, le facteur Gm(b) lié au facteur Gm(a) est constamment présent, alors que le facteur Gm(x) est absent.

— Les Chinois paraissent intermédiaires entre les Noirs et les Blancs.

— Les Indiens sont remarquables par leur faible taux de Gm(b+).

2) *Phénotypes.*

Les phénotypes, représentant l'association des 3 facteurs du système Gm chez un même sujet, sont indiqués pour la population blanche (région parisienne) dans le tableau II.

TABLEAU II

RÉPARTITION DES PHÉNOTYPES Gm
PARMI LA POPULATION DE LA RÉGION PARISIENNE

Phénotypes Gm	Nombre de cas	p. 100
Gm(a + x + b +)	84	11,92
Gm(a + x + b —)	33	4,68
Gm(a + x — b +)	211	29,93
Gm(a + x — b —)	30	4,25
Gm(a — x — b +)	347	49,22
Total	705	100,00

Étude statistique des résultats

a) *Race blanche*

La conception actuelle du système Gm(a,x,b) dans la population blanche est la suivante : il existe une série allélique de trois gènes *Gm^a, Gm^{ax} et Gm^b* (théorie de Harboe) :

— *Gm^a* déterminant le facteur Gm(a) ;

— *Gm^{ax}* déterminant simultanément les deux facteurs Gm(a) et Gm(x) ;

— *Gm^b* déterminant le facteur Gm(b).

Les gènes se combinent deux à deux en formant 5 phénotypes correspondant à 6 génotypes, comme le montre le tableau II bis.

TABLEAU II bis

PHÉNOTYPES ET GÉNOTYPES DU SYSTÈME Gm

Phénotypes	Génotypes
Gm(a + x + b +)	Gm^{ax} / Gm^b
Gm(a + x + b —)	Gm^{ax} / Gm^a ou Gm^{ax} / Gm^{ax}
Gm(a + x — b +)	Gm^a / Gm^b
Gm(a + x — b —)	Gm^a / Gm^a
Gm(a — x — b +)	Gm^b / Gm^b

A la suite de l'observation récente de deux cas de phénotype Gm(a—x+), Henningsen et Nielsen ont avancé l'hypothèse d'un gène très rare Gm^{bx}. De plus, Ropartz a émis l'hypothèse d'un très rare gène silencieux *Gm* qui, à l'état homozygote, serait responsable du phénotype Gm(a—x—b—) observé chez deux individus sains.

Si l'on met à part ces cas exceptionnels, la théorie génétique précédente rend compte des cinq phénotypes habituellement rencontrés chez les blancs et notamment :

a) de l'hérédité dominante de chacun des 3 facteurs considéré isolément ;

b) de l'association du Gm(x) au Gm(a), le phénotype Gm(x+) n'étant rencontré que chez les sujets Gm(a+) ;

c) de l'allélisme de Gm(a) et Gm(b) dans la population blanche.

L'étude des familles (22, 44, 49) ayant confirmé la théorie génétique précédente, nous comparerons les fréquences des phénotypes observées chez les blancs aux fréquences des phénotypes calculées à partir de cette théorie.

Le calcul des fréquences géniques a été effectué en utilisant la méthode du maximum de vraisemblance dont les formules ont été déterminées par Steinberg (51).

Si nous désignons par :

$$Gm^a = p$$
$$Gm^{ax} = q$$
$$Gm^b = r$$

les fréquences des trois allèles Gm^a, Gm^{ax} *et* Gm^b, les équations de probabilité maxima de ces fréquences sont :

$$p = 1 - q - r,$$

$$q = 1 - \sqrt{1 - Gm(a+b-x+) - \overline{Gm}(a+b+x+)}$$

$$r = \frac{Gm(a+b+x-) + Gm(a+b+x+)}{2} + Gm(a-b+x-)$$

et où $\overline{Gm}$ représente la fréquence du phénotype indiqué.

Le calcul basé sur les nombres des 5 phénotypes mentionnés dans le tableau II donne : p = 0,21284, q = 0,08674, r = 0,70142.

La fréquence des génotypes est :

Gm^a/Gm^a = 0,04488
Gm^a/Gm^{ax} = 0,03675
Gm^a/Gm^b = 0,29718
Gm^{ax}/Gm^{ax} = 0,00752
Gm^{ax}/Gm^b = 0,12168
Gm^b/Gm^b = 0,49199

La comparaison entre les valeurs expérimentales des nombres des phénotypes et les valeurs calculées en retenant l'hypothèse des 3 allèles Gm^a, Gm^{ax} et Gm^b montre la concordance de ces valeurs *(Tableau III)*.

La génétique donne ainsi une confirmation formelle de la valeur des réactions sérologiques.

TABLEAU III

COMPARAISON DES NOMBRES OBSERVÉS ET CALCULÉS DES DIFFÉRENTS PHÉNOTYPES CHEZ LES BLANCS DE LA RÉGION PARISIENNE

Phénotypes	Fréquence théorique	Nombre Observé	Nombre Calculé	p	D^2	χ^2
Gm(a+x+b+)	0,12168	84	85,8	1,8	3,2	0,037
Gm(a+x+b—)	0,04427	33	31.2	1,8	3,2	0,102
Gm(a+x—b+)	0,29718	211	209,5	1,5	2,3	0,011
Gm(a+x—b—)	0,04488	30	31,6	1,6	2,6	0,082
Gm(a—x—b+)	0,49199	347	346,9	0,1	0,01	0,000
	1,00000	705	705,0			0,233
$\chi^2 = 0{,}232$		ddl = 2		p = 0,85		

Ayant eu communication des résultats obtenus par Steinberg chez les Blancs des U.S.A., nous avons comparé ces résultats aux nôtres *(Tableau IV)*.

TABLEAU IV

COMPARAISON DES BLANCS DE FRANCE AUX BLANCS DES U.S.A.

Phénotypes Gm	Blancs de France		Blancs des U. S. A.	
	Nombre	Fréquence	Nombre	Fréquence
Gm(a + x + b +)	84	0,11915	42	0,13861
Gm(a + x + b —)	33	0,04681	11	0,03630
Gm(a + x — b +)	211	0,29929	87	0,28713
Gm(a + x — b —)	30	0,04255	14	0,04620
Gm(a — x — b +)	347	0,49220	149	0,49175
Total :	705	1,00000	303	0,99999

Le test de signification de Fisher (12) appliqué à ces deux répartitions montre *(tableau V)* une compatibilité parfaite ($\chi^2 = 1{,}355$, $0{,}80 < p < 0{,}90$).

TABLEAU V

TEST DE SIGNIFICATION DE FISCHER

	a+x+b+	a+x+b−	a+x−b+	a+x−b−	a−x−b+	N
U. S. A. a	$a_1 = 32$	$a_2 = 11$	$a_3 = 87$	$a_4 = 14$	$a_5 = 149$	303
France	84	33	211	30	347	705
Total N	$N_1 = 126$	$N_2 = 44$	$N_3 = 298$	$N_4 = 44$	$N_5 = 496$	1008
$\frac{\text{U.S.A.}}{\text{Total}} = p = \frac{a}{N}$	0,33333	0,25000	0,29195	0,31818	0,30040	0,30059
$a_i p_i$	13,99986	2,75000	26,39965	4,45452	44,75960	91,07877
$\Sigma a_i p_i = 91{,}36363$		$\Sigma a_i p_i - ap = 0{,}28486$			$pq = 0{,}21024$	
$\chi^2 = 1{,}355$		$0{,}80 < p < 0{,}90$				

Ropartz (44) a déterminé récemment la fréquence des phénotypes Gm chez 746 sujets de la Seine-Maritime. La comparaison de ses résultats aux nôtres ne montre pas de différence significative ($\chi^2 = 2{,}981$, ddl = 4, $p = 0{,}56$).

b) *Autres races*

Lorsqu'on considère les autres populations, noires, jaunes et indiennes, un fait est significatif : toutes ces populations possèdent le facteur Gm(a) avec une fréquence de 100 p. 100.

On pourrait se demander si, chez les Noirs africains, l'universalité du type Gm(a+) n'est pas due à la teneur en γ-globulines bien plus élevée chez eux que chez les Blancs.

Le dosage des protéines totales par la méthode classique du biuret a donné, comme valeur moyenne chez 280 Noirs 69,4 g par litre, chez 97 Européens 72,3 g par litre.

D'autre part, l'évaluation quantitative des fractions obtenues par électrophorèse sur papier a montré, chez les Noirs Africains, une proportion de γ-globulines très supérieure à celle que l'on observe chez les Blancs. Un travail précédent de Fine montrait en effet un taux de 16,5 % chez les Européens, alors que le taux était de 30,2 % chez les Africains. Cela revient à dire que le poids moyen de γ-globulines par litre est voisin de 12 g chez les Européens et de 21 g chez les Noirs Africains.

La quantité trouvée chez ceux-ci est donc 1,8 fois supérieure à celle trouvée chez les Européens. Ce taux nettement supérieur ne saurait toutefois, à lui seul, expliquer que tous les sérums africains que nous avons examinés soient Gm(a+). Autrement dit, on ne peut pas considérer qu'une partie d'entre eux sont en réalité des individus Gm(a—) dont le sérum n'est inhibiteur que parce que la quantité de γ-globulines est très élevée. Des épreuves d'inhibition quantitative nous ont en effet montré que le pouvoir inhibiteur de ces sérums est en moyenne trois fois supérieur au pouvoir inhibiteur des sérums d'Européens. Il semble donc qu'il faille rapporter la constance de la propriété Gm(a) chez les Noirs Africains non pas directement à l'augmentation du taux des γ-globulines dans ces sérums, mais au développement particulièrement intense de la fraction γ-globulinique qui supporte le pouvoir inhibiteur Gm(a+), pouvoir inhibiteur qui se développe sous l'action d'un mécanisme génétique. Une autre preuve que l'hyper-γ-globulinémie n'entraîne pas nécessairement un phénotype Gm(a+) est que nous avons trouvé Gm(a—) (Chapitre V) des individus blancs présentant une hyper-γ-globulinémie pathologique, et que Grubb (19) signale le cas d'une jeune fille atteinte d'une hépatite à plasmocytes appartenant au phénotype Gm(a—).

Les travaux de Steinberg (49), de Boyer et Milch (3) sur les Noirs d'Amérique, de Ropartz et coll. (42) sur les Noirs d'Afrique montrent que tous présentent le phénotype Gm(a+b+x—). De cette observation découle l'hypothèse émise par Steinberg et coll. (50) de l'existence dans les populations noires d'un unique gène Gm^{ab} déterminant simultanément la présence des facteurs Gm(a) et Gm(b). L'hypothèse d'un couple allélique Gm^{a} et Gm^{b} est impensable, car il faudrait admettre que le caractère homozygote Gm^{a}/Gm^{a} ou Gm^{b}/Gm^{b} est léthal. Les Noirs non métissés, comme ceux de Dakar, par exemple, seraient tous homozygotes pour ce gène Gm^{ab}. Ce gène n'existe pas dans la race blanche ou existerait avec une fréquence trop basse pour introduire une déviation statistiquement significative eu égard à l'effectif du matériel étudié par divers auteurs (7.100 cas). Une remarque s'impose à propos de l'hypothèse de Steinberg et coll. : il paraît difficile d'admettre que les deux gènes qui déterminent les facteurs Gm(a) et Gm(b) dans la population blanche y soient de vrais allèles, alors qu'un autre gène (ou groupement génique)) Gm^{ab} déterminerait simultanément ces deux mêmes facteurs dans d'autres populations. Nous devons néanmoins constater que l'examen de 7.100 sujets et les études familiales récemment effectuées par Steinberg (sur 214 familles comprenant 1.257 individus) et Ropartz (sur 70 couples et 182 enfants) confirment

statistiquement l'hypothèse génétique d'Harboe, à savoir l'existence de trois allèles Gm^a, Gm^b et Gm^{ax} dans la population blanche. L'anomalie que présentait l'existence d'un unique gène Gm^{ab} chez les Noirs vient de disparaître, Steinberg ayant récemment démontré que le Gm(b) des Noirs est différent du point de vue sérologique et génétique du Gm(b) des Blancs.

Une seconde hypothèse admet dans la population blanche la présence d'au moins quatre gènes : à un locus Gm^a et Gm^b ; au locus contigu Gm^x et Gm^y. Le produit de ce dernier gène serait encore inconnu. Ces deux loci ne pourraient être qu'étroitement liés, puisque seule la combinaison Gm^a/Gm^x semblerait exister, la combinaison Gm^b/Gm^x étant très rare. Si théoriquement ces deux hypothèses peuvent être envisagées, l'aspect pratique est plus simple, puisque les deux loci très étroitement liés se comportent comme un ensemble non dissocié, c'est-à-dire comme un seul locus.

Nous indiquerons les résultats obtenus par d'autres auteurs dans l'étude de la population jaune. Les fréquences des facteurs Gm observées chez les Chinois de Singapour ou des Etats-Unis sont analogues à celles que nous avons observées chez les Chinois de Macao. La fréquence observée du facteur Gm(b) est d'environ 95 %, mais l'on ne peut pas savoir encore dans l'état actuel de nos connaissances si les Chinois sont réellement 100 % Gm(b+), ne connaissant pas la proportion de métissage de ces Chinois. Les Japonais se distinguent des Chinois par une fréquence relativement basse (20 %) du facteur Gm(b) et une fréquence relativement élevée (30 %) du facteur Gm(x). Dans l'ensemble de la population jaune, si le phénotype Gm(a+) est présent à 100 %, les facteurs Gm(b) et Gm(x) présentent d'intéressantes variations ; l'hypothèse génétique proposée par Steinberg est l'existence de trois gènes : Gm^a, Gm^{ax} et Gm^{ab}, les combinaisons génotypiques de ces trois gènes ne permettant pas de réaliser le phénotype Gm(a—).

La distribution différentielle des gènes du système Gm se révèle un remarquable outil pour l'anthropologie : la présence de certains phénotypes dans une race où ils ne sont pas habituellement rencontrés ne peut s'interpréter que par un métissage.

A ces variations inter-raciales s'ajoute, à l'intérieur des populations blanches et jaunes, une hétérogénéité de la distribution des gènes. En Europe, la fréquence du facteur Gm(a) décroît avec la latitude. Sa fréquence est de 70 % en Finlande, 60 % en Angleterre. Pour la Belgique, la Suisse et la France, la fréquence de ce facteur Gm(a) se distribue autour de 50 %, pour atteindre en Italie une

moyenne de 40 %. Dans la population jaune, à la prédominance du gène Gm^{ab} chez les Chinois s'oppose celle du gène Gm^{a} parmi les Japonais.

Etude du mécanisme d'action des gènes sur les facteurs Gm

Les facteurs Gm sont supportés par des protéines et plus précisément par des γ-globulines 7S.

Le matériel génétique réglant la synthèse des protéines est l'A.D.N. chromosomique qui transmettrait son « information » à l'A.R.N. Trois A.R.N. interviendraient successivement et le dernier de ces A.R.N. assurerait la synthèse de la protéine par un mécanisme qui serait celui de la théorie « du code ».

La spécificité biologique des protéines dépend de leur constitution chimique et en particulier de la séquence des aminoacides contenus dans la protéine. Cette partie fondamentale de la structure des protéines, appelée structure primaire, est héréditaire, la synthèse des peptides étant contrôlée par des gènes. Elle détermine la structure secondaire, c'est-à-dire les différents types d'association des chaînes polypeptidiques, et finalement la structure tertiaire représentée par la configuration tridimensionnelle des protéines. L'influence déterminante de la structure primaire sur les propriétés de la molécule totale est clairement montrée par l'exemple des hémoglobines Hb A, Hb S et Hb C. Les différences dans la structure et le comportement électrophorétique de ces hémoglobines sont dues à un changement portant sur un seul amino-acide : parmi les 300 amino-acides de l'Hb A, un acide glutamique est remplacé par la valine ou la lysine dans les deux autres hémoglobines.

L'étude des animaux élevés aseptiquement a montré l'individualité physiologique des γ-globulines par rapport aux autres fractions protéiniques du sérum : la régulation du taux des γ-globulines est en rapport avec les incitations antigéniques du milieu.

Aucune différence chimique n'a pu être mise en évidence entre les γ-globulines douées d'activité anticorps et les γ-globulines de même mobilité électrophorétique qui sont dépourvues d'activité anticorps. Alors que les protéines sont synthétisées dans le foie, les γ-globulines anticorps sont élaborées par le système réticulo-histiocytaire et plus particulièrement par les plasmocytes.

D'après les vues de Haurowitz, la spécificité de l'anticorps est causée seulement par un mode particulier de plissement des chaînes peptidiques ; il en résulte la formation de « sites de combinaison » ajustés aux « groupements déterminants » de la molécule antigénique. Il y aurait lieu de faire une distinction entre la spécificité

héréditaire des protéines basée sur la séquence des amino-acides et la spécificité acquise des γ-globulines causée par l'altération de la structure secondaire et tertiaire.

Dans le cas des facteurs Gm supportés par les γ-globulines 7S, on peut envisager deux mécanismes possibles d'action du gène sur le facteur Gm qu'il contrôle : ou la spécificité Gm est due à la structure primaire de la molécule de γ-globuline ; ou cette spécificité est liée à une modification ultérieure de la structure tridimensionnelle de cette molécule par l'action d'un enzyme génétiquement contrôlé. Nous ne pouvons préciser lequel de ces deux mécanismes intervient, ne connaissant pas encore la différence de constitution chimique existant entre la γ-globuline 7S Gm(a+) et la γ-g obuline 7S Gm(a—). Une étude chimique des γ-globulines Gm(+) et Gm(—) est nécessaire pour élucider la question précédente. Nous signalerons à ce propos les études récentes portant sur les γ-globulines Gm(+). Porter a montré que les γ-globulines peuvent être dégradées par la papaïne en trois sub-unités structurales A, B et C de constante de sédimentation 3,5S. Fudenberg a constaté que les facteurs Gm sont localisés dans la sub-unité B, qui diffère des sub-unités A et C en ce qu'elle contient la quasi-totalité des hydrates de carbone de la molécule mère et qu'elle est dépourvue d'activité anticorps. Ces travaux, confirmés par Harboe, Osterland et Kunkel, prouvent, sans préjuger de l'action précise de la papaïne sur la molécule de γ-globuline, que les « sites » déterminant les facteurs Gm et les sites portant les fonctions anticorps sont situés sur des parties différentes de la molécule : d'après Edelman et Poulik, la molécule de γ-globuline paraît constituée par plusieurs chaînes de polypeptides réunies par des ponts disulfures. Il est possible que les localisations différentes observées pour les facteurs Gm et les fonctions anticorps correspondent à la conception courante « un gène — une chaîne polypeptidique », comme c'est le cas pour les hémoglobines. Selon cette conception, un gène possédant le « code » du « site déterminant » Gm contrôlerait la structure d'une portion de la molécule ; un gène indépendant contrôlerait la structure d'une autre partie de la molécule qui contient le « site de combinaison » anticorps.

Remarque

Les groupes Gm ayant comme support les γ-globulines sériques, il est intéressant d'étudier les groupes Gm sur des sérums présentant des variations importantes, en plus ou en moins, du taux des γ-globulines, comme nous l'avons vu à propos des Noirs. Mais en dehors de l'hyper-γ-globulinémie observée à l'état physiologique chez

ces derniers, de telles variations des γ-globulines sériques ne sont trouvées que chez des sujets malades.

Pour approfondir nos connaissances sur le Gm, nous avons été amenés à déterminer les groupes Gm sur des sérums de sujets atteints de maladie provoquant une augmentation ou une diminution importante du taux des γ-globulines sériques. C'est ainsi que nous avons examiné des sérums provenant de malades atteints de certaines formes de myélome ou de leucémie et qui présentaient pour cette raison une hypo-γ-globulinémie importante, ainsi que des sérums de malades atteints d'agamma-globulinémie. Inversement, nous avons examiné des sérums de cirrhotiques présentant une hyper-γ-globulinémie se distinguant de celle des Noirs par son caractère pathologique. Ce qui nous importait de connaître sur ces sujets, c'était moins le caractère de leur maladie que le taux de leur γ-globuline sérique, afin de voir si l'anomalie de ce taux était susceptible d'influencer la répartition des facteurs Gm chez ces sujets.

C'est pour cette raison que nous consacrerons le chapitre suivant à l'exposé des diverses méthodes d'évaluation du taux des γ-globulines sériques.

CHAPITRE IV

MÉTHODES D'ÉVALUATION DES GAMMA-GLOBULINES SÉRIQUES

Nous avons mis en pratique des méthodes générales d'étude des protéines du sérum, basées sur l'électrophorèse, qui seront utilisées dans la deuxième partie de ce travail et que nous appliquons ici à l'évaluation des seules γ-globulines. Afin d'obtenir une plus grande précision dans cette évaluation, nous avons mis au point une technique immunologique de titrage des γ-globulines basée sur l'inhibition par celles-ci du sérum antiglobuline.

I. Méthodes électrophorétiques

L'analyse électrophorétique se présente sous différentes modalités :

— Electrophorèse libre selon Tiselius ;

— Electrophorèse de zone : soit en papier, soit en gel gélose, soit en gel d'amidon.

La nomenclature électrophorétique, c'est-à-dire la distinction des protéines sériques en albumine, α, β et γ-globulines actuellement adoptée comme critère de base de toute classification, est due à Tiselius. Chaque famille de protéines a une mobilité définie et l'appellation d'α, de β et de γ-globulines adoptée pour les protéines séparées par d'autres modes électrophorétiques (papier, gelose ou gel d'amidon) doit être appliquée à des protéines ayant une mobilité α, β ou γ en électrophorèse libre, quel que soit leur emplacement en fin d'électrophorèse de zone.

L'électrophorèse libre, établissant la mobilité électrophorétique d'un composant protéique, reste donc la méthode de base, mais on lui préfère dans la pratique courante les méthodes d'électrophorèse de zone, où la migration se produit non plus en veine liquide, mais en immobilisant le milieu au sein d'un support poreux, mais rigide. Ces dernières méthodes présentent un progrès indéniable dans le domaine de l'étude des protéines en mettant à la portée des biochi-

mistes une technique d'électrophorèse à la fois simple, rapide et peu onéreuse. Elles présentent en outre le grand avantage de pouvoir être combinées avec des techniques différentes et de permettre ainsi le dénombrement de différentes protéines à l'intérieur des groupes primitivement séparés par Tiselius. C'est le cas de l'immunoélectrophorèse, que nous exposerons dans la deuxième partie de ce travail.

Nous nous en tiendrons ici à l'électrophorèse sur papier qui permet une évalution photométrique des γ-globulines et à l'électrophorèse en gel de gelose et en gel d'amidon qui ne permettent qu'une estimation visuelle, à moins de procéder à une élution.

1) Electrophorèse sur papier.

Effectuée avec rigueur dans certaines conditions expérimentales, elle permet une évaluation quantitative des fractions protéiques. La technique que nous avons utilisée (9) est très voisine de celle décrite par Grassman et Hannig (16). Il s'agit d'une électrophorèse horizontale réalisée sur l'appareil de J. Groulade et dont les conditions expérimentales sont les suivantes :

Tampon véronal/véronal sodé/lactate de calcium, pH 8,6.

Papier Schleicher et Schull 2043 aMgL, bandes de 4 cm de large.

L'intensité du courant est de 1,25 mA par bande pendant 5 heures, la différence de potentiel étant de 6,5 volts/cm.

La fixation est réalisée par séchage à l'infra-rouge (1.200 Watts) pendant 20 mn.

Coloration des protéines par l'amidoschwarz 10 B, saturé par le méthanol acétique à 10 p. 100. Décoloration dans le même solvant.

La photométrie est réalisée sur l'enregistreur d'extinction de Zeiss après avoir rendu les bandes transparentes par imprégnation à l'huile de vaseline. Les taux des différentes fractions protéiques sont exprimés en pourcentage du taux des protéines totales qui est mesuré par la méthode du biuret.

2) Electrophorèse en gélose.

L'électrophorèse est réalisée dans un gel de gélose à une concentration finale de 1,5 % en tampon véronal de pH 8,2 et de faible force ionique (0,025). La gélose est coulée sur des plaques de verre photographique de 13×8 ou de 18×24 selon la technique préconisée par Grabar (14). Migration de 4 heures sous 5 volts/cm.

3) Electrophorèse en gel d'amidon.

Elle est réalisée à l'aide d'une technique (10, 11) dérivée de celle de Smithies (46). Le gel d'amidon est préparé suivant le principe suivant :

De l'amidon hydrolysé commercial (*) est mis en suspension à une concentration convenable dans du tambon borate de molarité indiquée sur chaque flacon d'amidon commercial.

Après homogénéisation, on chauffe le mélange sans cesser d'agiter violemment jusqu'à prise en masse.

Le chauffage est poursuivi jusqu'au début de l'ébullition du gel. Cette ébullition est poursuivie sous vide jusqu'à formation de grosses bulles. On se

(*) Connaught Medical Laboratory - Toronto, Canada.

débarrasse des bulles en produisant une dépression brutale (en enlevant le bouchon de caoutchouc du récipient branché sur la trompe à vide).

Le gel ainsi obtenu est coulé dans des cuves de plexiglass de dimensions intérieures 234 × 80 × 6 mm, permettant la migration parallèle dans un même gel du sérum à étudier et d'un sérum normal témoin.

Après refroidissement du gel pendant 5 heures minimum, deux réservoirs sont taillés dans le gel à l'aide d'un emporte-pièce métallique de 20 × 2 mm; chaque sérum est alors inclus dans son réservoir sous forme d'un mélange avec de l'amidon soluble Merk.

Cet amidon soluble, à une concentration de 30 % dans le tampon borate 0,3 M, est liquéfié par ébullition, puis ramené à 40°C, et ensuite mélangé à parties égales avec le sérum.

Les ponts de jonction aux bacs d'électrophorèse sont réalisés par du papier épais (papier filtre COFRAM MAB C 3) imprégné du tampon des bacs (tampon borate 0,3 M).

On applique aux bornes du gel une différence de potentiel de 4 volts/cm pendant 16 heures. L'intensité obtenue est de 10 mA par plaque de 80 mm de large.

Après électrophorèse, les gels d'amidon sont coupés perpendiculairement à leur axe pour obtenir deux tranches de 3 mm d'épaisseur. Les faces internes de ces tranches sont alors :

1) Fixées dans l'eau acétique à 5 % pendant 1 heure.
2) Colorées pendant 1 minute dans une solution :

Amidoschwarz 10 B	1 g
Méthanol	500 ml
Eau distillée	500 ml
Acide acétique	100 ml

3) Décolorées dans le même solvant : méthanol/eau/acide acétique.

II. Méthode immunologique

Cette méthode est basée sur le principe de la réaction de Coombs, c'est-à-dire sur le pouvoir que possède un sérum antiglobuline humaine d'agglutiner les globules rouges sensibilisés par un anticorps incomplet qui, ici, est un anticorps anti-Rh.

L'anticorps incomplet anti-Rh se fixe sur l'antigène Rh du globule rouge, sans que celui-ci soit agglutiné (anticorps fixé). Les globules rouges ainsi « sensibilisés » peuvent être alors agglutinés à l'aide d'un sérum antiglobuline humaine (préparé en immunisant un lapin par de la globuline humaine) ; l'anticorps anti-Rh étant de nature globulinique, l'antiglobuline réalise un pont entre les globulines fixées à la surface des hématies sensibilisées et il en résulte l'agglutination de ces hématies.

En vertu de la même réaction immunologique, ce sérum antiglobuline humaine aura son pouvoir agglutinant neutralisé totalement ou partiellement après sa mise en contact avec une solution de globulines humaines. Tel est le principe de la « réaction d'inhibition de l'antiglobuline humaine » préconisée par Wiener et coll., en

1949, pour détecter de faibles quantités de globulines (56) et appliquée par le même auteur (55) au diagnostic des agammaglobulinémies. Grubb a apporté certaines précisions sur la spécificité de la réaction (17).

MATÉRIEL ET TECHNIQUE

Nous décrirons les propriétés du sérum antiglobulinique, la réaction d'agglutination et l'épreuve d'inhibition de l'agglutination. Nous procéderons ensuite à l'étalonnage de la réaction et à l'étude de sa spécificité.

1. Sérum antiglobulinique.

Il s'agit d'un sérum de bœuf immunisé par voie intra-veineuse avec du sérum humain total (AGH 138). Ce sérum, convenablement débarrassé de ses agglutinines hétérospécifiques, est dilué au demi en glycérol pour sa conservation.

L'analyse immunoélectrophorétique de cet antisérum montre qu'il contient les anticorps précipitants suivants :

1) Anti-γ-globulines,
2) Anti-β_2-Macroglobuline,
3) Anti-β_2A-globuline,
4) Anti-sidérophiline β_1,
5) Anti-α_2-Macroglobuline,
6) 2 Anti-alpha 1,
7) Anti-albumine.

2. Système agglutinant.

Les globules rouges O CcDEe d'un même sujet, conservés à — 20°C en solution citrate-phosphate glycérolée à 40 %, sont sensibilisés par un même sérum anti-D de la manière suivante :

On mélange 3 volumes de sérum anti-D, titrant 1/128 par la réaction de Coombs, à 1 volume de culot globulaire lavé.

La sensibilisation s'effectue pendant 15 minutes au Bain-Marie à 45° C.

Les globules sensibilisés sont lavés et mis en suspension à 1 p. 100. Le sérum antiglobulinique (AGH 138) agglutine sur plaque ces globules sensibilisés à la dilution de 1/160 (la dernière dilution donnant une agglutination visible à l'œil nu après un temps de contact de 5 minutes).

Le sérum antiglobulinique est utilisé à la dilution de 1/20 (8 unités agglutinantes) pour l'épreuve d'inhibition de l'antiglobuline.

3) Epreuve d'inhibition de l'antiglobuline.

a) On réalise une série de dilutions du sérum dont on désire connaître la teneur en γ-globulines, à partir de 1/20 jusqu'à 1/5120 (progression géométrique de raison 1/2).

b) 0,05 ml de chacune des dilutions est mélangé sur plaque avec 0,05 ml de sérum *AGH 138* dilué à 1/20.

Après 5 minutes de contact, on ajoute 0,05 ml de suspension à 1 p. 100 des globules sensibilisés.

c) Lecture : après mélange et agitation, la lecture est faite au bout de 5 minutes. Toute dilution du sérum à examiner entraînant une absence d'agglutination du système AGH/GR sensibilisés révèle une neutralisation de la quantité d'AGH entrant dans la réaction.

4. **Etalonnage et spécificité de la réaction.**

a) 50 sérums normaux testés inhibent tous jusqu'à la dilution de 1/640.

b) Une solution de γ-globulines immunochimiquement pures et à une concentration de 1 g p. 100, soit 500 microgrammes pour 0,05 ml, inhibe l'AGH à la dilution de 1/320, soit à une dose de 1,5 microgramme dans 0,05 ml de la dilution.

c) Cette réaction d'inhibition est essentiellement le fait des γ-globulines.

En effet, si l'on recherche le pouvoir inhibiteur de solutions de protéines isolées, on peut noter que l'albumine, les α_2-globulines (l'haptoglobine et la céruloplasmine), une β_1-globuline (la sidérophiline), sont dépourvues de pouvoir inhibiteur aux concentrations habituellement trouvées dans le plasma.

TABLEAU I

INHIBITION PAR LES PROTÉINES SÉRIQUES

	Taux inhibiteur	Taux dans le sérum	Réaction d'inhibition
	en grammes pour 100		
Albumine	>4	4	0
Haptoglobine	0,3	0,1	0
Céruloplasmine	0,22	0,03	0
Sidérophiline	0,20	0,25	pur
Gamma-globulines	0,0015	1	1/640

Ces solutions de protéines isolées sont dues à l'obligeance de M^me^ Steinbuch, du Service de Fractionnement des Protéines plasmatiques du Centre National de Transfusion Sanguine de Paris.

Application à des sérums pathologiques

La méthode précédente a été appliquée à des sérums de sujets atteints de myélome, de leucémie ou de cirrhose, qui provoquent des variations importantes, en plus ou en moins, du taux des γ-globulines sériques.

Nous indiquerons, à titre d'exemple, les résultats obtenus dans deux cas d'agammaglobulinémie et dans soixante-dix-sept cas de myélome.

1) *Agammaglobulinémie.*

C'est dans le cas de l'agammaglobulinémie que la sensibilité de l'inhibition de l'antiglobuline présente son plus grand intérêt, en permettant d'apprécier quantitativement d'infimes quantités de γ-globulines qui ne peuvent être décelées par d'autres méthodes.

En effet, deux sérums se présentant en électrophorèse sur papier ou à l'analyse immunoélectrophorétique comme véritablement privés

de γ-globulines, se montrent cependant inhibiteurs, mais à des taux très bas (1/10e et 1/5e), dans les conditions de nos expériences.

Un tel taux d'inhibition paraît indiquer non l'absence totale des γ-globulines, mais leur présence en quantité de 50 à 100 fois inférieure à celle d'un sérum normal, soit *des quantités de l'ordre de 0,01 à 0,02 g p. 100.*

2) *Myélomes.*

Les sérums de sujets atteints de myélome présentent un double intérêt pour une étude fondamentale du Gm. Ils renferment une paraprotéine dont la mobilité et la parenté antigénique sont déterminées respectivement par l'électrophorèse et l'immuno-électrophorèse, ce qui permet leur classification en β_2A-myélome, γ-myélome et, rarement myélome sans paraprotéine.

De plus, on observe fréquemment une hypo-γ-globulinémie dans les β-myélomes. Bien que le taux anormal des γ-globulines du myélome soit la seule caractéristique du myélome qui nous intéresse, la présence d'une paraprotéine doit être mentionnée, elle peut fausser le résultat de l'inhibition par l'antiglobuline quand cette paraprotéine présente une communauté antigénique avec les γ-globulines.

Au cours d'un travail précédent (8), les 77 sérums myélomateux étudiés avaient été classés en trois catégories d'après leurs caractéristiques antigéniques :

a) Myélomes à paraprotéine antigéniquement reliée aux γ-globulines (figurés par A sur le diagramme).

Sur un total de 39 sérums, 22 présentaient un taux d'inhibition augmenté (supérieur à 1/640e), 8 un taux normal et 9 un taux d'inhibition abaissé (jusqu'à 1/80e).

b) Myélomes à paraprotéine antigéniquement reliée à la β_2A-globuline (figurés par B sur le diagramme).

Sur un total de 23 cas, un seul sérum présentait un taux de γ immunologique supérieur à 1/640e, un autre avait un taux normal et 21 sérums présentaient un taux d'inhibition abaissé allant jusqu'à 1/80.

c) Myélomes sans altération à l'électrophorèse (figurés par C sur le diagramme) ; ils peuvent présenter soit une augmentation, soit un taux normal, soit un taux très fortement abaissé pouvant atteindre le 1/20e. La figure 1 montre la distribution de ces 3 types de myélomes en fonction du taux d'inhibition.

III. Valeurs comparées des méthodes

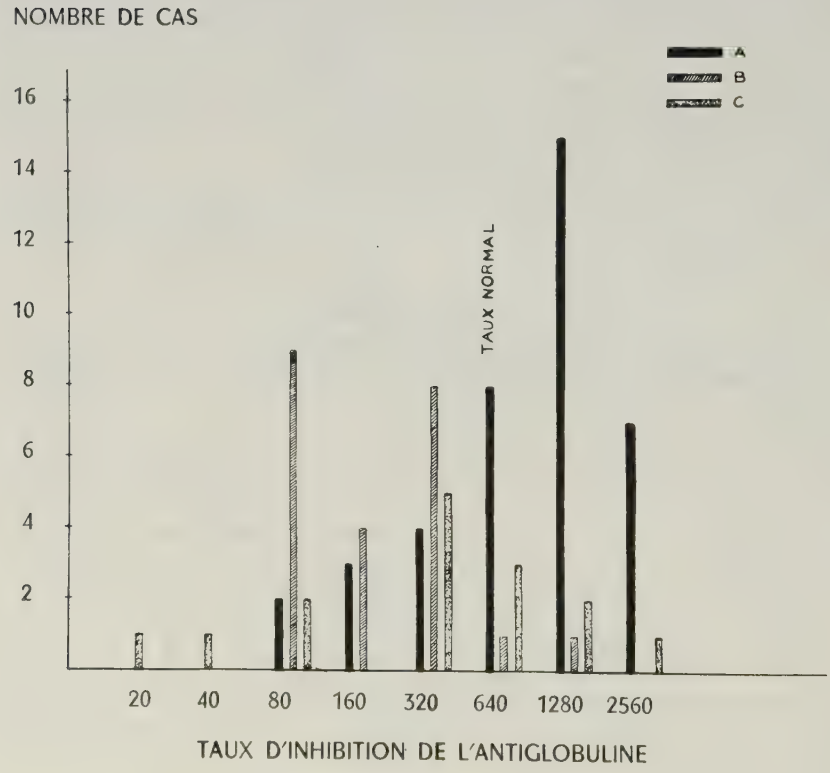
Trente électrophorèses sur papier, suivies de planimétrie, effectuées sur le même sérum ont montré que la précision de cette méthode était de ± 10 p. 100.

Afin de connaître la signification relative d'une hypo ou d'une hyper-γ-globulinémie, il est nécessaire de connaître les variations du taux normal des γ-globulines. L'estimation quantitative des γ-globulines par électrophorèse sur papier (9) montre que le pourcentage de cette fraction a une valeur moyenne de 20 % ± 3 chez des sujets d'âge compris entre 20 et 40 ans. Si l'on prend 72 g par litre comme poids moyen des protéines totales, on obtient une valeur moyenne de 14 g par litre de γ-globulines. Les chiffres admis classiquement pour les γ-globulines (évaluées par d'autres méthodes) sont de 9 à 11 g par litre. Cette différence doit être attribuée au fait que l'estimation quantitative des γ-globulines repose sur une réaction colorée dans laquelle le coefficient de fixation du colorant employé (amidoschwarz 10 B) est plus important pour les γ-globulines que pour l'albumine.

FIGURE I

RÉPARTITION DES TAUX D'INHIBITION

POUR LES TROIS TYPES DE MYÉLOMES



La méthode immunologique présente un avantage incontestable sur la méthode électrophorétique pour l'appréciation de faibles traces de γ-globulines, comme nous l'avons vu à propos de l'agammaglobulinémie.

Dans le cas des myélomes, la présence d'une paraprotéine dont la mobilité peut être γ et « l'antigénicité » γ, soulève une difficulté dans l'interprétation des résultats fournis par les deux techniques.

a) Les paraprotéines de *mobilité* β ont rarement « l'antigénicité » γ. Cette paraprotéine n'interviendra pas par sa mobilité pour gêner l'estimation de la zone des γ-globulines sur l'électrophorégramme, pas plus qu'elle n'interviendra par son « antigénicité » dans l'interprétation de l'épreuve d'inhibition.

b) Les paraprotéines de *mobilité* γ, au contraire, se superposant aux γ-globulines normales sur l'électrophorégramme, fausseront toujours par excès l'estimation de celles-ci. Leur intervention dans l'épreuve immunologique d'inhibition dépend de « l'antigénicité » de cette paraprotéine.

— Dans le cas de « l'antigénicité » non γ, c'est-à-dire des « antigénicités » β_2A ou des « antigénicités » nulles, la réaction immunologique d'inhibition n'est nullement perturbée.

— dans le cas de « l'antigénicité » γ, il n'est plus possible de faire la part de la paraprotéine et celle des γ-globulines normales. Cependant, si le taux d'inhibition est trouvé abaissé, cette valeur constitue une limite supérieure du taux réel des γ-globulines et permet de déceler ainsi une hypo-γ-globulinémie.

CHAPITRE V

GROUPES SÉRIQUES Gm
ET VARIATIONS DU TAUX DES GAMMA-GLOBULINES

Les groupes sériques Gm ayant comme support les γ-globulines sériques, nous avons souligné l'intérêt que présentait l'étude de ces groupes sur des sérums présentant des variations importantes du taux des γ-globulines. De telles variations n'étant pas observées à l'état physiologique (exception faite de l'hyper-γ-globulinémie physiologique des Noirs), nous avons dû faire appel à des sérums de sujets atteints de certaines maladies provoquant soit une diminution, soit une augmentation importante de cette fraction sérique. Bien que cette étude présente par ailleurs un intérêt indéniable pour la pathogénie de ces maladies, les sérums étudiés ne nous intéressent ici que par leurs taux anormaux des γ-globulines, en vue d'approfondir nos connaissances sur le système des groupes sériques Gm.

I. Groupes Gm dans les hypo-gamma-globulinémies

A. — *MYÉLOMES.*

L'évaluation immunologique du taux des γ-globulines a révélé que les myélomes à paraprotéine de mobilité β présentaient une déficience marquée en γ-globulines sériques (Chapitre IV). Il est logique de supposer que cette déficience marquée en γ-globulines (support des facteurs Gm) peut entraîner des changements dans l'intensité de la réaction d'inhibition qui permet de distinguer les sérums Gm(+) des sérums Gm(—).

Nous avons recherché la répartition des facteurs Gm(a), Gm(b) et Gm(x) chez 79 sujets atteints de myélome multiple, dont 75 présentaient une paraprotéine dont la mobilité électrophorétique et les propriétés immunochimiques étaient connues (8). Nous avons en outre comparé ces résultats à ceux du titrage immunologique des γ-globulines.

1. — *Répartition des types Gm dans le sérum total de sujets présentant un myélome.*

Cette répartition est donnée dans le tableau I, en même temps que celle concernant une série de 705 sujets normaux (donneurs du Centre National de Transfusion Sanguine).

TABLEAU I

PHÉNOTYPES Gm DANS LES SÉRUMS DE MYÉLOMES

Phénotype Gm	Sérums de Myélomes		Sérums normaux	
	Nombre	p. 100	Nombre	p. 100
Gm(a + x + b +)	7	8,86	84	11,92
Gm(a + x + b —)	3	3,80	33	4,68
Gm(a + x — b +)	21	26,58	211	29,93
Gm(a + x — b —)	4	5,06	30	4,25
Gm(a — x — b +)	39	49,37	347	49,22
Gm(a — x — b —)	5	6,33	0	0,00
Total :	79	100,00	705	100,00

Une seule et très importante différence existe entre ces deux séries. Elle porte sur la constatation, dans la catégorie des myélomes, de cinq cas où le sérum n'est inhibiteur pour aucun des trois sérums anti-Gm employés et auxquels on peut donc attribuer le phénotype apparent Gm(a—x—b—). Or, dans la catégorie des donneurs, aucun type de ce genre n'a été observé. Etant donné le grand nombre des sérums normaux testés, cette différence est très significative. Nous qualifions ce phénotype d'apparent, car il est incompatible avec la théorie génétique de la transmission des facteurs Gm actuellement admise, qu'il ne s'observe jamais chez les sujets normaux ayant un taux normal de γ-globulines, et qu'il peut être dû, au moins dans certains cas, à l'artifice que constitue la disparition partielle ou quasi-totale des γ-globulines physiologiques.

On notera, par ailleurs, que les fréquences observées dans les deux séries pour les types Gm(a+x+b—), Gm(a+x—b—) et Gm(a—x—b+) concordent d'une façon remarquable. Au contraire, la fréquence des types Gm(a+x+b+) et Gm(a+x—b+) est moindre dans la série « myélomes » que dans la série « normale ». Dans la première, elle est pour les deux types ensemble de 35,44 p. 100 ; dans la seconde, de 41,85 p. 100. La différence est de 6,31 p. 100. Elle est très voisine de 6,33 p. 100 qui est la fréquence des sérums

appartenant au « type Gm »(a—x—b—) et existant seulement dans la série « Myélomes ». Il serait tentant de penser que ces sérums Gm(a—x—b—) appartiennent en réalité au type Gm(a+x+b+) ou au type Gm(a+x—b+). Il est possible, en effet, que les facteurs Gm(a) et Gm(b) se trouvant ensemble chez un même individu soient tous deux moins inhibiteurs pour les sérums anti-Gm(a) et anti-Gm(b) que chacun des facteurs pris isolément dans un sérum qui ne contient que lui ; il pourrait s'agir là d'un phénomène de «dosage» comme on en rencontre souvent en sérologie des groupes sanguins.

2) *Phénotypes et taux immunologique de γ-globulines.*

Les taux d'inhibition de l'antiglobuline trouvés sur les 79 sérums de myélome sont rapportés dans le tableau II, en fonction du phénotype Gm. Nous y avons indiqué seulement les facteurs Gm(a) et Gm(b) : les sujets Gm(x+) s'étant toujours révélés Gm(a+), le facteur Gm(x) n'apporterait aucun élément supplémentaire.

TABLEAU II

PHÉNOTYPES Gm ET TAUX DES γ-GLOBULINES DANS LE MYÉLOME

TAUX DE γ-GLOBULINES (dernière dilution inhibant l'antiglobuline)	PHÉNOTYPES Gm				TOTAL
	Gm(a+b+)	Gm(a+b—)	Gm(a—b+)	Gm(a—b—)	
1/20				1	1
1/40			1		1
1/80	2		8	1	11
1/160	2		5	1	8
1/320	6	2	10	1	19
1/640	6	2	4	1	13
1/1280	7	1	10		18
1/2660	5	2	1		8
TOTAL :	28	7	39	5	79

La classe la plus intéressante de ce tableau est celle du type Gm(a—b—). Etant donné le petit nombre des sérums appartenant à cette classe et leur répartition dans un intervalle assez large de

taux d'inhibition de l'antiglobuline, il n'est pas possible de dire que cette répartition diffère significativement de celle des sérums présentant les phénotypes classiques. On notera cependant que l'un des sérums Gm(a—b—) comporte un taux de γ-globulines particulièrement bas (la dernière dilution inhibitrice étant 1/20). Le tableau III réunit quelques indications supplémentaires concernant ces cinq sérums.

TABLEAU III

CARACTÉRISTIQUES DES CINQ MYÉLOMES Gm (a−x−b−)

Sérum de myélome	Mobilité de la paraprotéine	Nature immunochimique de la paraprotéine	Inhibition de l'antiglobuline	Evaluation électrophorétique des γ globulines
n° 1	β_2	β_2A	1/320	diminuées
n° 2	β_2	β_2A	1/160	diminuées
n° 3	β_1	β_2A	1/80	diminuées
n° 4	β_1	γ	1/640	diminuées
n° 5	pas de paraprotéine		1/20	diminuées
Sérum normal, pas de paraprotéine			1/640	normales

3) *Interprétation des résultats.*

Grubb (19) fait état de 18 sujets présentant une diminution considérable de la γ-globuline : aucun de leurs sérums n'a été capable d'inhiber le sérum anti-Gm(a). Ces sujets ont été étudiés par Grubb et Laurell (19), et par Vaughan et Good (54).

Nous avons déterminé le groupe Gm des deux sérums (mentionnés au chapitre IV) provenant de sujets agammaglobulinémiques, où l'électrophorèse sur papier et l'immunoélectrophorèse ne décelaient aucune trace de γ-globuline, et qui présentaient des taux très bas d'inhibition de l'antiglobuline (1/10 et 1/5). Ces deux sérums apparaissaient Gm(a—x—b—).

L'abaissement du taux des γ-globulines, qu'il soit pathologique ou qu'il soit constaté chez le nouveau-né (30,4), aboutit donc à une raréfaction telle des groupement inhibiteurs Gm que le type réel

du sujet peut être impossible à établir. Dans le cas du déficit pathologique, on ne trouve aucun des facteurs Gm. Dans celui du nouveau-né, le type trouvé est celui de la mère.

Le tableau III permet de constater que tous les sérums Gm(a—b—) présentent à l'électrophorèse une diminution de la γ-globuline. Mais parmi les sérums que nous avons étudiés, plusieurs comportaient aussi une quantité abaissée de cette protéine, tout en restant capable de donner lieu à une réaction Gm parfaitement lisible. En outre, le taux de γ-globuline trouvé en inhibant le sérum antiglobulinique est très variable. Le sérum dont le taux est, de ce point de vue, le plus faible, est bien Gm(a—b—). Mais entre 1/80 et 1/640, intervalle de variation dans lequel se trouvent compris les quatre autres sérums Gm(a—b—), on rencontre un grand nombre d'échantillons présentant aussi une hypo-γ-globulinémie à l'électrophorèse, dont le type Gm(a+b+), Gm(a+b—) ou Gm(a—b+) est parfaitement reconnaissable.

Pour éclaircir le problème précédent, nous avons donné à examiner à Ropartz nos sérums de myélome. Ce dernier, utilisant six sérums anti-Gm(b) différents, a constaté que certains sérums de myélome apparaissent Gm(b+) avec certains sérums ant-Gm(b) et Gm(b—) avec d'autres sérums anti-Gm(b). D'après Ropartz, les discordances précédentes s'expliqueraient par le fait que le facteur Gm(b) serait constitué — du moins dans le cas du myélome — par une mosaïque de facteurs possédant entre eux des structures antigéniques semblables.

Ces divers résultats montrent l'intérêt de l'étude des myélomes pour préciser certains problèmes touchant les groupes Gm.

B. — *LEUCÉMIES*

Dans 142 cas de leucémies (aiguë, myéloïde ou lymphoïde), le résultat des déterminations des taux de γ-globulines par la méthode immunologique révèle des variations du taux des γ-globulines beaucoup moins importantes que dans les myélomes précédemment examinés.

La détermination des facteurs Gm a été réalisée sur ces 142 sérums de leucémies. Les sérums de sujets leucémiques ne se distinguent pas des sérums de sujets normaux dans le domaine des groupes Gm ; nous n'avons rencontré aucun sérum de type (a—b—x—), comme cela s'était produit dans le cas des myélomes et cette étude ne nous apporte pas de notions nouvelles sur les groupes sériques Gm.

II. Groupes Gm dans les hyper-gamma-globulinémies

A. — *HYPER-GAMMA-GLOBULINÉMIE DES CIRRHOSES*

Nous avons déterminé les trois facteurs Gm sur des sérums de cirrhotiques où les γ-globulines avaient été titrées par la méthode immunologique utilisant l'inhibition de l'antiglobuline. Sur 19 sérums de cirrhotiques examinés, 9 présentaient un titre de γ-globulines double du titre normal. Parmi ces 9 sérums hyper-γ-globulinémiques, nous avons trouvé 5 fois le caractère Gm(a—), 9 fois le caractère Gm(x—) et 2 fois le caractère Gm(b—). Ceci nous prouve que le caractère Gm(—) peut se manifester malgré un taux anormalement élevé de γ-globulines et confirme que l'universalité du type Gm(a+) chez les Noirs est dû non à leur taux physiologiquement élevé de γ-globulines, mais au développement particulièrement intense de la fraction de γ-globuline qui supporte le pouvoir inhibiteur, pouvoir inhibiteur qui se développe sous l'action d'un mécanisme génétique.

B. — *HYPER-GAMMA-GLOBULINÉMIE DES GAMMA-MYÉLOMES*

Parmi les sérums pathologiques dont nous avions mesuré les taux de γ-globulines (chapitre IV) par la méthode immunologique figuraient 39 sérums de myélomes à paraprotéine antigéniquement reliée aux γ-globulines, dont 22 présentaient un taux de γ-globulines double du taux normal. La détermination des facteurs Gm de ces 22 sérums nous a révélé la présence des facteurs Gm(—), comme dans le cas des sérums de cirrhotiques hyper-γ-globulinémiques. Cependant, dans le cas particulier des myélomes à paraprotéine reliée antigéniquement aux γ-globulines, il nous est impossible, dans le résultat du dosage immunologique, de faire la part de ce qui revient aux γ-globulines et de ce qui revient à la paraprotéine, puisqu'elles possèdent toutes deux l'« antigénicité » γ.

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE
DES SÉRUMS NORMAUX ANTI-Gm ET DE LEUR ACTIVITÉ ANTI-Gm

CHAPITRE VI

MÉTHODES D'ÉTUDE ET DE FRACTIONNEMENT DU SÉRUM

Pour l'étude des sérums normaux anti-Gm et de la localisation sérique de leurs activités anti-Gm, nous avons utilisé diverses méthodes basées respectivement sur :

— la précipitation chimique,
— la chromatographie,
— l'électrophorèse de zone,
— l'analyse immunoélectrophorétique.

I. MÉTHODE DE PRÉCIPITATION CHIMIQUE

1) Précipitation des euglobulines par l'eau distillée à 4° C.

Les euglobulines précipitent en milieu de faible force ionique.

a) Réactifs : Eau distillée tamponnée à pH 5,3 par du tampon véronal/acétate.

Solution A :

Acétate de sodium (3 H_2O)	9,714	g
Véronal sodé	14,714	g
Eau distillée Q.S.P.	500	ml

Solution B :

Solution A	10	ml
HCl N	1,4	ml
Eau distillée Q.S.P.	50	ml

L'eau distillée tamponnée à basse force ionique est obtenue en mettant 50 ml de la solution B dans 500 ml d'eau.

b) Technique : La précipitation est réalisée à 4° C, soit par dilution (1 volume de sérum + 10 volumes d'eau tamponnée, séjour de 24 heures à 4°C), soit par dialyse du sérum contre un grand volume d'eau distillée tamponnée, pendant 24 heures à 4°C.

Le précipité obtenu est dissous dans 1 volume de ClNa à 9 p. 1.000 cinq fois inférieur au volume initial de sérum.

Le surnageant est rendu isotonique par addition de ClNa à 9 p. 100, afin de pouvoir y rechercher l'activité anti-Gm à l'aide de globules rouges sensibilisés.

2) Précipitation par le sulfate d'ammonium à 33 p. 100 et à 40 p. 100 de saturation.

Un volume de sérum est additionné d'un demi-volume de solution saturée de sulfate d'ammonium. Le précipité obtenu, lavé avec une solution de sulfate d'ammonium à 33 p. 100 de saturation, puis dissous dans un volume de ClNa à 9 p. 1.000 cinq fois inférieur au volume initial de sérum, constitue la fraction I. Le surnageant de la précipitation est amené de la concentration 33 p. 100 à la concentration 40 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium par l'addition d'une quantité adéquate de sulfate d'ammonium saturé ; le nouveau précipité

ainsi obtenu est lavé par une solution de sulfate d'ammonium à 40 p. 100 de saturation et redissous dans un volume cinq fois inférieur au volume initial de sérum : il constitue la fraction II.

Avant de rechercher l'activité anti-Gm dans la fraction I, la fraction II et le dernier surnageant, nous les avons débarrassés du sulfate d'ammonium par dialyse contre du ClNa à 9 p. 1.000 pendant 24 heures à 4°C. La fraction I s'étant seule révélée douée d'activité anti-Gm, elle a été sous-fractionnée par dialyse contre l'eau distillée tamponnée à pH 5,3, à 4°C pendant 24 heures, selon la technique décrite au paragraphe précédent.

3) Précipitation des γ-globulines par l'héparine en présence de chlorure de Cobalt (méthode de Burstein) (5).

Dans un premier temps on débarrasse le sérum des bêta-lipoprotéines que l'on précipite par l'héparine et le chlorure de calcium. Dans un deuxième temps on provoque la floculation des γ-globulines par l'héparine et le chlorure de cobalt (il est nécessaire d'éliminer les bêta-lipoprotéines qui sont insolubilisées par l'héparine et le chlorure de cobalt).

Réactifs :

a) Solution 0,025 M de Cl_2Ca (550 mg de Cl_2Ca anhydre R.P. dans 200 ml d'eau distillée).

b) Solution 0,025 M de Cl_2Co tamponnée à pH 7,4 dans du chlorure de sodium à 2,5 p. 1.000.

Dans une fiole jaugée de 200 ml, on ajoute 10 ml de tampon de Michaelis, 1 ml de HCl N, 0,50 g de ClNa, enfin 1,19 g de chlorure de cobalt (Cl_2Co, 6 H_2O R.P., PM : 238). On complète à 200 ml avec de l'eau distillée exempte de CO^2 (tampon de Michaelis : 9,714 g d'acétate de sodium (3 H^2O) et 14,714 g de véronal sodique dans 500 ml d'eau distillée).

c) Solution d'héparine à 5 p. 100 (5.000 unités par centimètre cube).

Protocole :

A 20 ml de la solution (a) on ajoute 2 ml de sérum et 0,100 ml de la solution (c). Les bêta-lipoprotéines précipitent sélectivement et après centrifugation pendant 10 minutes à 6.000 t/m on obtient un surnageant exempt de bêta-lipoprotéines.

A 200 ml de la solution (b), on ajoute 20 ml du surnageant et 4 ml de la solution (c). Un trouble apparaît, très important. On centrifuge 60 mn après (6.000 t/m). Le précipité séparé est lavé à trois reprises avec la solution (b) additionnée d'héparine (2 ml de solution (c) pour 100 ml de solution (b)) et redissous dans 2 ml d'une solution de citrate de sodium à 1 p. 100 dans du chlorure de sodium à 9 p. 1.000 (volume initial du sérum).

II. MÉTHODE CHROMATOGRAPHIQUE

La méthode de Stanworth (47), qui permet de préparer rapidement des γ-globulines 7S présentant un haut degré de pureté, utilise comme échangeur d'anions la diéthylaminoéthyl-cellulose (traitée selon la méthode de Peterson et Sauber) (34), qui adsorbe toutes les protéines du sérum autres que les γ-globulines 7S.

Un faible volume (2,5 ml) de sérum, préalablement dialysé pendant 16 heures à 4°C contre un litre de tampon phosphate disodique (pH 7,5, 0,01 M) contenant 0,015 M ClNa, est additionné goutte à goutte, en agitant constamment, à de la diéthyl-amino-éthyl-cellulose humide (17 g de poids humide). Celle-ci a été équilibrée avec le tampon phosphate disodique précédent et les 17 g de poids humide (c'est-à-dire du produit obtenu après centrifugation) ont été mélangés avec 2,5 ml de ce même tampon refroidi à 4°C. Après que ce mélange ait été

placé pendant 5 heures à 4°C, une nouvelle quantité de 5 ml de tampon phosphate disodique lui est ajoutée, et le tout est centrifugé à 3.000 tours/minute pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est examiné en immuno-électrophorèse et l'activité anti-Gm y est recherchée.

III. MÉTHODES ÉLECTROPHORÉTIQUES

Les méthodes d'électrophorèses de zone (sur papier, gélose et gel d'amidon) ont été décrites dans le chapitre IV.

IV. ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE

L'analyse immuno-électrophorétique due à Grabar et Williams (15) consiste : dans un premier temps, à séparer les différentes fractions protéiques du sérum à étudier par électrophorèse en gélose ; dans un deuxième temps, on fait diffuser, perpendiculairement au sens de la migration électrophorétique, un sérum animal anti-sérum humain total, c'est-à-dire le sérum d'un animal ayant élaboré par immunisation une série d'anticorps précipitants contre la plupart des constitutants protéiques du sérum humain.

La double diffusion de l'antigène et de l'anticorps correspondant entraîne la formation d'une ligne de précipitation spécifique, chaque ligne dénombrée en immunoélectrophorèse correspondant à un antigène présent dans le sérum humain normal. L'anti-sérum le plus couramment employé est le sérum de cheval anti-sérum humain (mélange commercialisé par l'Institut Pasteur de Paris) (cheval ASH). Ce sérum peut être utilisé soit complet, soit débarrassé de ses anticorps anti-γ-globulines (par épuisement à l'aide des γ-globulines pures), ce qui permet une meilleure mise en évidence des lignes de précipitation de la β_2A-globuline, le plus souvent masquée par la ligne de précipitation des γ-globulines.

Le sérum de cheval ASH standard de l'Institut Pasteur permet de dénombrer, du point de vue immunologique, les protéines suivantes :

α_1	1) L'albumine
	2) L'orosomucoïde (ou séromucoïde acide)
	3) L'α_1-glycoprotéine (α_1A de Burtin)
α_2	4) L'α-lipoprotéine (mobilité albumine en gélose)
	5) L'haptoglobine
	6) La céruloplasmine
	7) L'α_2-macroglobuline
	8) Les β-lipoprotéines (migrant en gélose comme α_2-globuline)
β_1	9) La sidérophiline
	10) La β_1A-globuline
	11) Une autre β_1
β_2	12) La β_2A de Heremans
	13) La β_2M-globuline
γ	14) Ligne de γ-globulines.

Dans nos travaux, nous avons utilisé la microméthode de Scheidegger (45) avec les anti-sérums suivants :

— Sérum de cheval anti-sérum humain total de l'Institut Pasteur (lot 13411).
— Sérum de cheval anti-sérum humain 1299 pur et épuisé par les γ-globulines.

V. MÉTHODE D'ÉLECTROPHORÈSE – ELUTION

1) **Principe.**

Cette méthode combine la migration électrophorétique sur papier (papier épais), l'élution et l'analyse immuno-électrophorétique.

Dans un premier temps, on sépare les différentes fractions protéiques en soumettant le sérum étudié à la migration sur papier.

Dans un deuxième temps, on découpe le papier en 15 bandes perpendiculairement à l'axe de migration et l'on procède à l'élution des fractions protéiques contenues dans chacune de ces bandes.

Enfin, sur les éluats ainsi obtenus, on examine la composition immunochimique et l'on recherche l'activité envisagée.

2) **Technique.**

a) L'électrophorèse du sérum à fractionner est réalisée sur papier Wattman épais n° 3, de 10 cm de largeur. Préalablement à la migration, ce papier Wattman est divisé en quinze bandes par des traits de crayon tracés à la règle perpendiculairement à l'axe de la migration, ces traits étant distants de 5 mm. Le volume de sérum déposé sur les 10 cm de largeur est de 1 à 2 ml. Les conditions générales de l'électrophorèse sont celles décrites au chapitre IV.

b) Aussitôt que l'électrophorèse est terminée (afin d'éviter l'évaporation), le papier Wattman est découpé en bandes de 5 mm, perpendiculairement à l'axe de migration, selon les traits préalablement tracés. Chacune de ces bandes, numérotées de 1 à 15 (la bande n° 1 comportant la ligne de dépôt), est mise dans une seringue de 1 ml où elle est soumise à la pression du piston afin d'en extraire le liquide. On obtient ainsi 15 éluats contenant chacun une portion des différentes fractions sériques.

Avant le découpage perpendiculaire à l'axe des 15 bandes, les deux bords latéraux du papier avaient été découpés parallèlement à l'axe de migration et colorés à l'amidoschwarz selon la technique habituelle, afin de servir de témoin pour la migration.

c) Chacun des éluats est soumis à l'analyse immuno-électrophorétique.

Dans chacun de ces éluats, on recherche également l'activité anti-Gm.

CHAPITRE VII

ÉTUDE DES SÉRUMS NORMAUX ANTI-Gm

Mise en évidence de l'anti-Gm des sérums normaux

Milgrom et coll. (29), en 1956, ont montré que certains sérums de malades atteints d'affection non rhumatoïde (10 sur 2.000) présentent la propriété d'agglutiner les globules rouges de groupe 0 Rh positif sensibilisés par un anticorps incomplet, c'est-à-dire contiennent un facteur antiglobulinique. Ce « facteur agglutinant de Milgrom » a été retrouvé par Unger et coll. (53), en 1958, dans 0,60 p. 100 des sérums de donneurs de sang adultes en bonne santé (3.487 sujets examinés). Ropartz et coll. (37, 38), recherchant systématiquement cette antiglobuline humaine chez les sujets normaux, l'ont trouvée dans 0,33 p. 100 des sérums (sur 4.000 sérums), en 1958, dans 2,07 des sérums (sur 7.882 sérums), en 1960.

Le pouvoir agglutinant décrit par Milgrom ne disparaissait pas quand on ajoutait de la γ-globuline pure. Cette absence d'inhibition paraît traduire une nette distinction entre les sérums de polyarthrite chronique évolutive (P.C.E.) et les sérums divers. Cependant, comme l'a montré Grubb (20) en distinguant deux types d'agglutination, le type rhumatoïde (inhibé par la γ-globuline) et le type non rhumatoïde (non inhibé par la γ-globuline), il existe des sérums des deux sortes aussi bien chez les sujets atteints de P.C.E. que chez des individus atteints d'affections diverses ou même apparemment normaux.

Fait important, Ropartz et coll. (39) ont remarqué que certains des sérums agglutinants qui sont inhibés par la γ-globuline humaine sont susceptibles de servir à la détermination des structures du système Gm. Ils ont ainsi décrit des sérums normaux doués de spécificité anti-Gm(a) (40), anti-Gm(b) (43) ou anti-Gm(x) (41). Les groupes sériques du système Gm, initialement définis par le pouvoir inhibiteur que possèdent certains sérums vis-à-vis des facteurs agglutinants présents dans le sérum de sujets atteints de polyarthrite chronique évolutive, peuvent donc être déterminés en utilisant l'activité anti-Gm de certains sérums normaux.

Avantage de l'anti-Gm du sérum normal

Dans ce cas, le principe de la réaction reste le même, mais la technique diffère par certaines modalités relatives à l'inhibition : la capacité d'inhibition des sérums Gm(+) vis-à-vis des sérums de P.C.E. convenablement dilués, est environ 10 fois plus forte que celle des sérums Gm(—). Par contre, un sérum normal anti-Gm, employé pur, est inhibé par un sérum Gm(+) même dilué au 1/128, alors qu'il n'est pas inhibé par un sérum Gm(—), même employé pur (voir tableaux II et III, chapitre I).

La différence entre un sérum Gm(+) et un sérum Gm(—) se traduit donc par une différence du pouvoir inhibiteur vis-à-vis des sérums de P.C.E., alors qu'elle se traduit par une inhibition ou une non-inhibition vis-à-vis des sérums normaux anti-Gm.

Sur le plan pratique, l'utilisation des sérums normaux doués d'activité anti-Gm évite l'ajustage réciproque, souvent délicat, des dilutions des sérums agglutinants et des sérums à tester, et présente l'avantage de supprimer les réactions intermédiaires.

Détection des sérums normaux anti-Gm

D'une étude systématique portant sur 8.000 sérums de donneurs (28) et rapportée dans le tableau I, nous avons retenu, pour une étude plus approfondie, 12 sérums anti-Gm dont la spécificité et le titre agglutinant sont indiqués dans le tableau II.

TABLEAU I

SÉRUMS POSSÉDANT UN POUVOIR AGGLUTINANT POUR LES GLOBULES SENSIBILISÉS

Les phénotypes des sérums anti-D sont les suivants : Cha... est Gm(a+x—b—), Bau... est Gm(a+x+b—) et Lab... est Gm(a—x—b+).

Globules sensibilisés par l'anti-D :	1ère Sélection	2e Sélection (essais d'inhibition)			
	Nombre total de sérums agglutinant ces globules sensibilisés	Sérums non inhibés donc non spécifiques jusqu'à ce jour	Sérums inhibés		Spécificité Anti-
			non spécifique	spécifiques d'un facteur Gm	
Cha...	7	0	0	7	Gm(a)
Bau...	3	2	0	1	Gm(x)
Lab...	9	3	0	6	Gm(b)
Cha..., Bau...,	7	1	0	6	Gm(a)
Cha..., Bau..., Lab...,	9	9	0	0	
TOTAUX	35	15	0	20	

Cet examen de 8.000 sérums de donneurs de la région parisienne a été complété par l'examen de 5.000 donneurs de province. C'est ainsi qu'au total il a été trouvé sur 13.000 sérums de sujets normaux :

— 18 sérums anti-Gm(a),
— 9 sérums anti-Gm(b),
— 2 sérums anti-Gm(x).

TABLEAU II

CARACTÉRISTIQUES DES 12 SÉRUMS ANTI-Gm ÉTUDIÉS

N°	Nom	Spécificité	Titre 1/
1	Ste ...	anti-Gm(a)	32
2	Mor ...	anti-Gm(a)	32
3	Del ...	anti-Gm(a)	32
4	Dup ...	anti-Gm(a)	8
5	Ama. .	anti-Gm(a)	4
6	Adn ...	anti-Gm(a)	4
7	Ven ...	anti-Gm(b)	64
8	Che ...	anti Gm(b)	16
9	Fab ...	anti-Gm(b)	8
10	Pen ...	anti-Gm(b)	8
11	Chr ...	anti-Gm(x)	32
12	Thi ...	anti-Gm(x)	16

L'examen clinique et l'étude des antécédents de ces 12 sujets n'ont révélé aucun phénomène pathologique sauf dans un cas, le n° 2, Mor..., qui avait été atteint de P.C.E. il y a six ans. Il s'agissait de 7 femmes et de 5 hommes, d'âge variant entre 32 et 60 ans et déclarant n'avoir jamais reçu de transfusion.

Nous avons alors examiné le sérum de ces 12 sujets du point de vue sérologique et du point de vue biochimique.

Étude de 12 sérums anti-Gm

A. — *ETUDE SEROLOGIQUE*

Le facteur rhumatoïde, responsable des troubles sérologiques de la P.C.E., est mis en évidence (entre autres réactions) par la réaction de Waaler-Rose. Un faible pourcentage de sujets indemnes de P.C.E. peut présenter cette réaction. Nons avons recherché si tel

était le cas de nos 12 sujets, en utilisant la réaction de Waaler-Rose modifiée (36) ou réaction d'agglutination des globules rouges humains de groupe 0 sensibilisés par un immun-sérum de lapin.

Matériel.

Le sérum à examiner peut être utilisé soit à l'état frais, soit après congélation à — 20°C. Les globules rouges humains provenant d'un sujet du groupe 0, prélevés sur citrate de soude, sont utilisables entre 24 et 72 heures après le prélèvement.

L'immun-sérum de lapin a été préparé en immunisant les lapins à l'aide de globules rouges humains de groupe 0 pendant 3 à 4 mois. Ayant déterminé le titre de l'hémagglutinine complète de cet immun-sérum vis-à-vis de globules rouges humains, on sensibilise ceux-ci avec une dose non agglutinante de ce sérum (par ex. 1/2, 1/3, 1/4, etc. de la dose minima agglutinante). Après vérification sur une grande série de sérums positifs et négatifs des résultats obtenus à l'aide des globules rouges sensibilisés avec les doses différentes d'immun-sérum de lapin, il a été choisi pour cette réaction la dose sensibilisante qui donne des résultats concordants avec ceux obtenus précédemment par la réaction de Heller-Svartz.

Technique.

a) Sensibilisation des globules rouges.

On mélange un volume d'une suspension à 2 p. 100 de globules rouges (lavés préalablement) à un égal volume d'une dilution en eau physiologique de sérum sensibilisant à la dose non agglutinante préalablement déterminée ; le mélange, effectué en versant rapidement le sérum dilué dans la suspension globulaire et en les transvasant trois à quatre fois, est laissé à l'étuve à 37°C pendant une heure.

b) Réaction d'agglutination :

Un volume de 0,2 ml de la suspension globulaire ainsi sensibilisée est ajouté dans une série de tubes contenant chacun 0,2 ml d'une dilution de sérum du malade (dilutions progressives allant de 1/4 à 1/1024) ; les tubes sont alors placés au Bain-Marie à 37° pendant une heure.

Pour chaque série examinée, on ajoute trois témoins : un sérum témoin positif de titre connu, un sérum témoin négatif et un témoin des globules rouges sensibilisés (pour vérifier l'absence d'agglutination spontanée dans l'eau physiologique). Pour chaque sérum, on contrôle dans un tube témoin l'absence de pouvoir agglutinant vis-à-vis de globules rouges non sensibilisés (on mélange une goutte de sérum non dilué et une goutte de suspension de globules rouges à 1 p. 100).

c) Lecture de la réaction :

Après une heure, on pratique une première lecture en examinant à l'aide d'un miroir concave la partie inférieure du tube. Après un séjour d'environ 15 heures des tubes à 4°C, on laisse réchauffer les tubes pendant 30 mn à la température du laboratoire et on fait une deuxième lecture. La plus forte dilution du sérum donnant des agglutinats visibles à l'aide du miroir concave, lors de cette deuxième lecture, indique son titre agglutinant vis-à-vis des globules rouges humains 0 sensibilisés. On considère que la réaction est négative si le titre agglutinant est égal ou inférieur à 1/8, qu'elle est douteuse s'il est égal à 1/16, et positive s'il est égal ou supérieur à 1/32 (il atteint souvent 1/256 et parfois 1/1024).

Résultats

Onze des sérums anti-Gm examinés donnaient une réaction négative ; seul le n° 2, Mor..., connu pour ses antécédents de P.C.E., donnait une réaction faiblement positive (1/32).

B. — *ETUDE BIOCHIMIQUE*

Les résultats de cette étude, effectuée à l'aide des techniques décrites au chapitre précédent, sont les suivants :

1) L'électrophorèse sur papier montre, à l'estimation visuelle, une augmentation modérée des γ-globulines dans environ la moitié des cas (Planche 1). Le sérum n° 2 (Mor...), dont la P.C.E. ancienne se réflétait par une réaction de Waaler-Rose positive, montrait une très forte élévation des β et des γ-globulines.

2) L'électrophorèse sur gel d'amidon (Planche 2) et l'analyse immuno-électrophorétique (Planche 3) ne montrent pas d'anomalies protéiques. Les « immunoglobulines » β_2A, β_2M et γ sont présentes dans tous les sérums.

Remarque.

L'électrophorèse sur papier du n° 2 Mor..., montrant une anomalie des protéines, a été pratiquée sur un sérum prélevé en novembre 1960, alors que les autres examens ne montrant plus cette anomalie ont été pratiqués sur un prélèvement effectué huit mois plus tard.

3) Le dosage des protéines totales du sérum par la méthode du biuret a mis en évidence des taux compris entre 65 g et 75 g par litre.

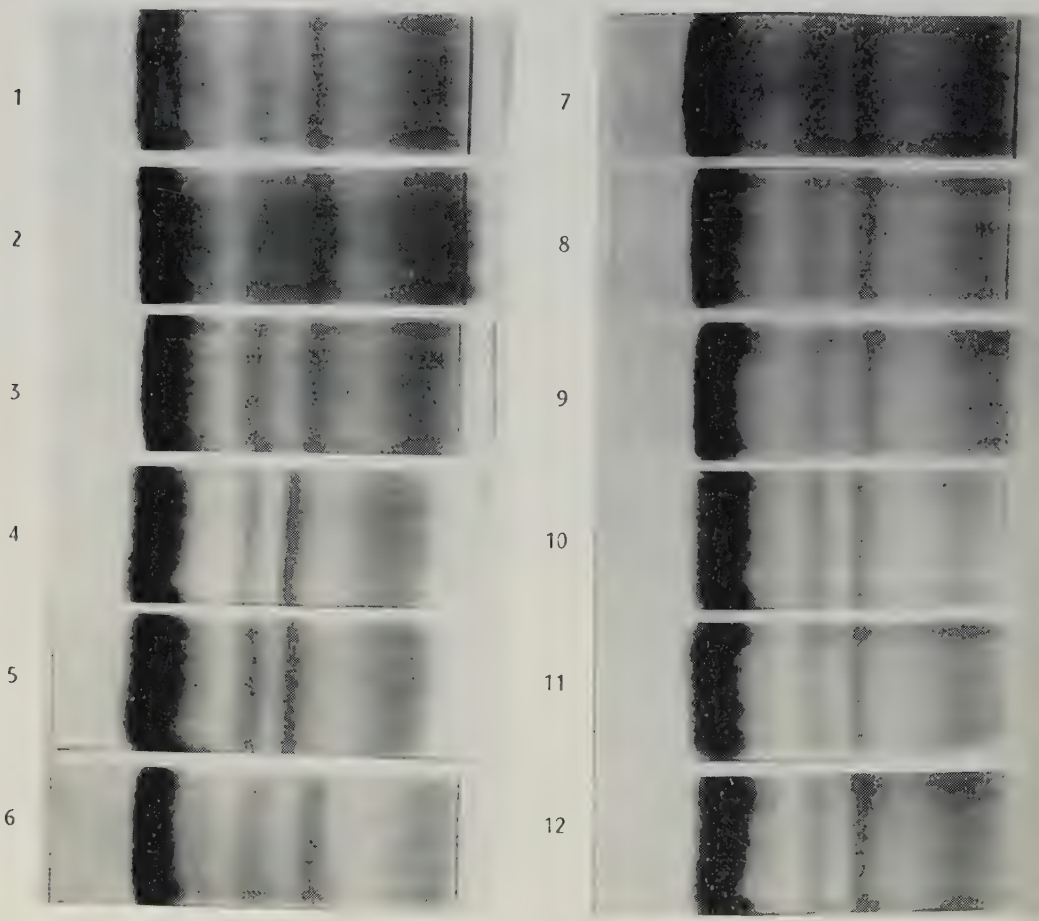


PLANCHE 1 — Electrophorèse sur papier des 12 sérums normaux anti-Gm.

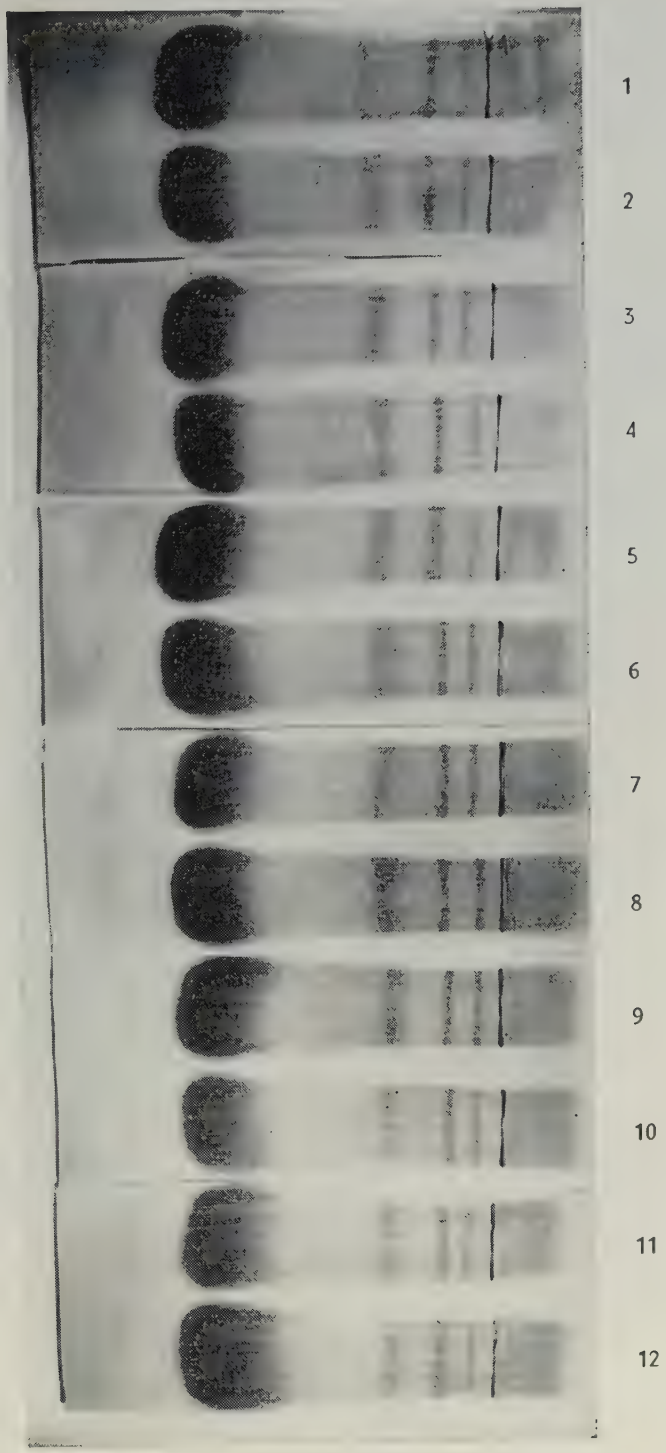


PLANCHE 2 — Electrophorèse sur gel d'amidon des 12 sérums normaux anti-Gm.

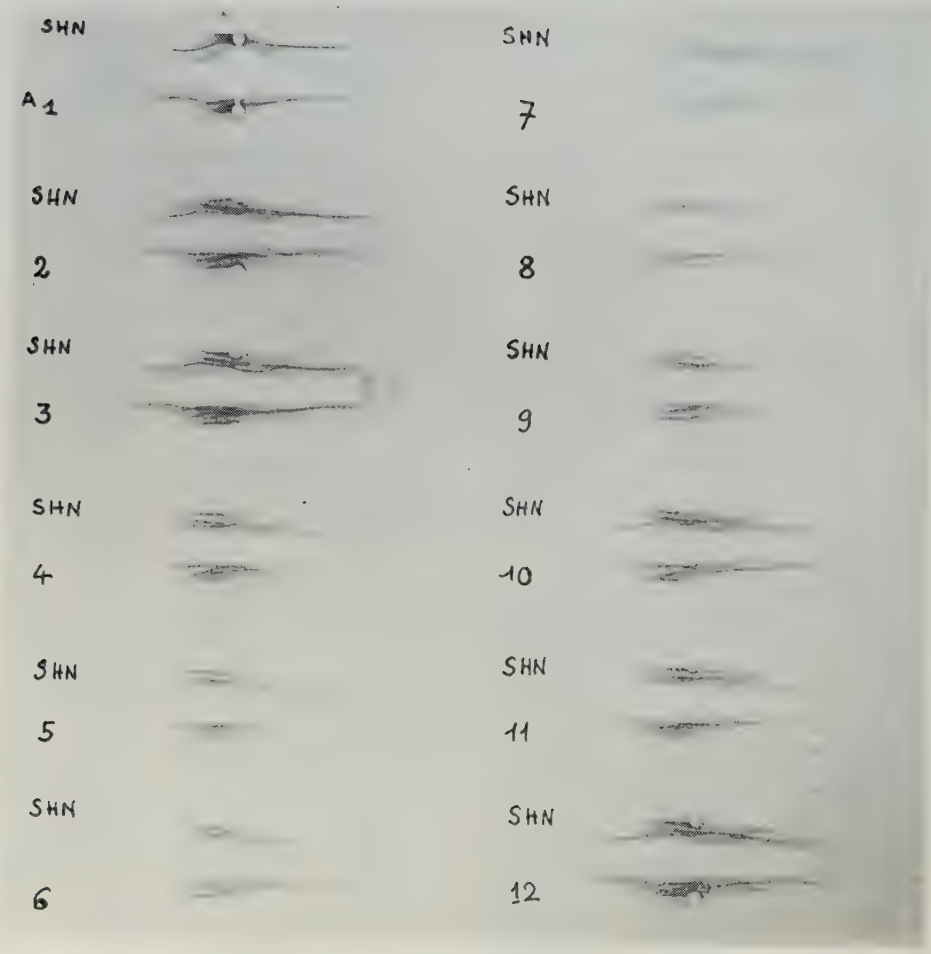


PLANCHE 3 — Analyse immunoélectrophorétique des 12 sérums normaux anti-Gm.

CHAPITRE VIII

ÉTUDE PHYSICO-CHIMIQUE DE L'ACTIVITÉ ANTI-Gm

Dans ce chapitre nous avons recherché la localisation biochimique de l'activité anti-Gm et examiné l'action de certains agents physiques et chimiques sur cette activité. La méthode chromatographique a été appliquée à la purification du support de l'activité anti-Gm(a). Par des méthodes d'ultracentrifugation, nous avons cherché à préciser la nature macroglobulinique du support de cette activité.

A. Localisation biochimique de l'anti-Gm

Nous avons recherché quelle était la localisation de l'activité anti-Gm en appliquant les diverses techniques de fractionnement exposées au Chapitre VI, à un sérum anti-Gm(a), à un sérum anti-Gm(b) et à un sérum anti-Gm(x) pris parmi les 11 sérums anti-Gm précédemment sélectionnés.

Les résultats obtenus ont été identiques, quel que soit le type anti-Gm considéré :

1) L'activité anti-Gm est présente dans les euglobulines précipitant à 4° C à faible force ionique et à pH 5,3. Chaque sérum a été soumis à une dialyse de 24 heures à 4° C et à pH 5,3. Le précipité obtenu est lavé, puis solubilisé dans du ClNa à 9 p. 1000 sous un volume 5 fois plus faible que le volume initial de ce sérum.

a) Les surnageants de dialyse, rendus isotoniques par addition de ClNa à 9 p. 100, sont totalement dépourvus d'activité anti-Gm.

b) Les précipités d'euglobulines contiennent l'activité anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x).

L'analyse immunoélectrophorétique de ce précipité d'euglobulines redissous montre que ces euglobulines contiennent (Fig. I) :

— des γ-globulines 7S,
— la β_2-Macroglobuline (γ19S),
— la β_1A-globuline,
— une β_1A différente de la sidérophiline,
— enfin une α_1-globuline.

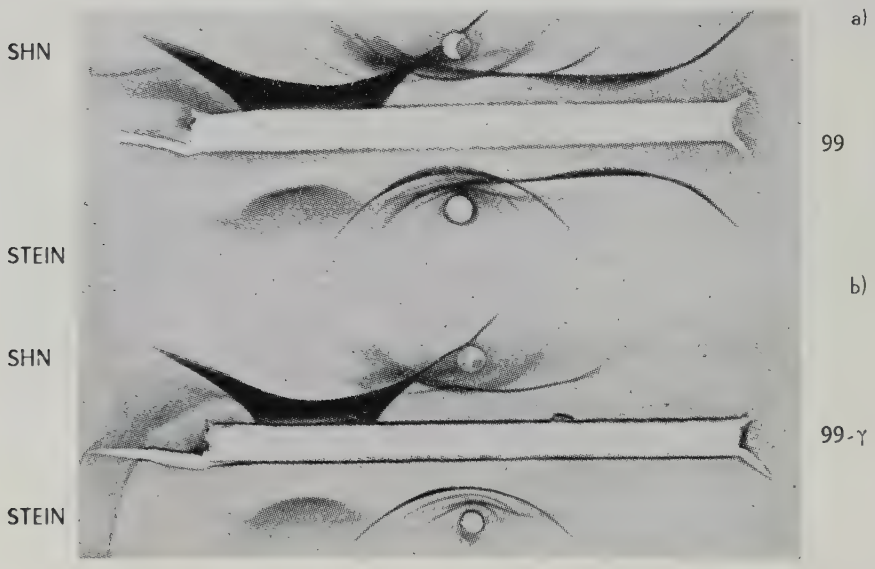


FIGURE I

ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE DE LA FRACTION EUGLOBULINIQUE, OBTENUE A pH 5,3, DU SÉRUM ANTI-Gm(a) STEIN, EXAMINÉE :

en a), par l'antisérum 1299
en b) par l'antisérum 1299 épuisé par les γ-globulines
SHN : sérum humain normal témoin

2) *L'activité anti-Gm est présente dans les globulines précipitant par le sulfate d'ammonium.*

a) La fraction précipitée par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation contient l'activité anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x).

b) La fraction précipitée en portant la concentration en sulfate d'ammonium à 40 % de saturation sur le surnageant de la précipitation à 33 %, est dépourvue d'activité anti-Gm.

c) Les activités anti-Gm sont présentes dans les fractions euglobuliniques obtenues à partir des fractions précipitées par le sulfate d'ammonium à 33 % de saturation.

Examinée par l'analyse immunoélectrophorétique, la fraction 33 % de sulfate d'ammonium contient diverses protéines. Seules les protéines existant à la fois dans ces précipités et dans les euglo-

bulines précipitant à pH 5,3 pourront être le support des activités anti-Gm : c'est le cas de la β_2M-globuline, de la β_1A-globuline et des γ-globulines 7S.

La β_2A-globuline peut être éliminée car elle ne figure pas dans la fraction euglobulinique. L'α_2-Macroglobuline de Schultze peut être également éliminée car elle n'existe pas dans les préparations précédentes douées d'activité anti-Gm. Elle est d'ailleurs connue pour être une pseudoglobuline précipitant entre 38 % et 48 % de saturation en sulfate d'ammonium.

3) *L'activité anti-Gm est absente des préparations de γ-globulines 7S* obtenues soit par chromatographie sur diéthylaminoéthyl-cellulose selon la méthode de Stanworth, soit par précipitation par l'héparine en présence de chlorure de cobalt selon la méthode de Burstein. Nous nous sommes assurés que le traitement par la diéthylaminoéthyl-cellulose aux pH et molarités utilisés ne détruisait pas l'activité anti-Gm.

L'analyse immunoélectrophorétique de ces deux préparations montre essentiellement une ligne de γ-globulines. Nous rapportons, dans la fig. II, l'image obtenue avec la première de ces préparations (concentrée 12 fois).

FIGURE II

ANALYSE IMMUNO-ÉLECTROPHORÉTIQUE
A L'AIDE DE L'ANTISÉRUM 1299 DE LA PRÉPARATION DE γ-GLOBULINES OBTENUE PAR LA MÉTHODE DE STANWORTH ET CONCENTRÉE 12 FOIS

en haut : SHN est un sérum humain normal témoin
en bas : préparation concentrée 12 fois (par dialyse contre le subtosan à 25 %)

4) L'électrophorèse sur papier des trois sérums anti-Gm, suivie de découpage-élution, a montré que *l'activité anti-Gm se trouvait localisée dans la zone* β_2 γ_1, contenant la β_2A, la β_2M et les γ-globulines.

Les résultats de l'étude biochimique précédente sont résumés dans le tableau I.

B. Action d'agents physiques ou chimiques sur l'activité anti-Gm

Nous avons observé des résultats identiques pour chaque type d'activité anti-Gm.

1) *Action de la chaleur.* Les activités anti-Gm sont thermostables à 56° C pendant 30 minutes, mais disparaissent par chauffage à 63° C pendant 10 minutes.

2) *Action des variations de pH.* Les activités anti-Gm(a), anti-Gm(b), ou anti-Gm(x) ne sont pas modifiées entre les pH 6,5 et 9, comme nous l'ont montré les titrages des sérums anti-Gm effectués en faisant successivement varier le pH par incréments de 0,5 unité pH.

3) *Dialyse contre le chlorure de sodium à 9 p. 1000.* L'activité anti-Gm subsiste inchangée après une dialyse de 24 heures à + 4° C contre une solution de ClNa à 9 p. 1.000.

Rappelons que le facteur agglutinant non anti-Gm de Milgrom est inactivé, d'après Beck (2), par une telle dialyse.

4) *Action des agents sulfhydrilés.* Deutsch et Morton (6) ont montré que les agents sulfhydrilés (mercaptoethanol, cystéine) sont capables de transformer, par rupture des ponts disulfures S-S, aussi bien les macroglobulines pathologiques que les macroglobulines du sérum humain normal en sous-unités moléculaires plus petites (de l'ordre de 6,5 S). Filiti-Wurmser et coll. ont prouvé que la β_2M du sérum était une macrobuline 19S (7).

TABLEAU I *(page ci-contre)*

Kunkel et coll. (26) ont constaté que le Facteur Rhumatoïde localisé dans les γ-globulines 19S (γ_1-macroglobulines) perdait son activité agglutinante lorsqu'il était scindé en sous-unités par le mercaptoéthanol.

Nous avons soumis à l'action de deux agents réducteurs chacun des trois sérums anti-Gm, selon la technique utilisée par Deutsch et Morton (6). Les sérums sont traités, à la température ordinaire, par du chlorhydrate de cystéine 0,2M pendant 24 heures, ou par du chlorhydrate de 2-mercaptoéthylamine 0,1M pendant trois heures. Les solutions de ces réactifs effectuées en tampon phosphate monopotassique de pH 7,4 et de force ionique 0,2 ont été préalablement neutralisées à l'aide de soude normale. Après dialyse de 24 heures contre le même tampon phosphate, on recherche l'activité anti-Gm de chaque sérum examiné : l'activité anti-Gm a complètement disparu.

TABLEAU I

NATURE BIOCHIMIQUE DU FACTEUR AGGLUTINANT ANTI-Gm (anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x)) DU SÉRUM NORMAL

MODE DE FRACTIONNEMENT DU SÉRUM ANTI-GM	FRACTION PRÉPARÉE	ACTIVITÉ ANTI-GM	COMPOSITION IMMUNO-CHIMIQUE
Dialyse contre l'eau distillée (24 H. à 4° C et pH 5,3)	Euglobulines précipitant à 4° C à pH 5,3	Présente	β_1A, β_2M (γ 19 S), γ (7 S)
Précipitation par $SO_4(NH_4)_2$ à 33 p. 100 de saturation + Dialyse contre l'eau distillée (24 H. à 4° C et pH 5,3)	Fraction euglobulinique des globulines précipitant par $SO_4(NH_4)_2$ à 33 p. 100 de saturation	Présente	β_1A, β_2M (γ 19 S), γ (7 S)
Chromatographie sur DEAE-cellulose (méthode de STANWORTH)	γ-globulines	Nulle	γ (7 S)
Précipitation par l'héparine en présence de chlorure de cobalt (méthode de BURSTEIN)	γ-globulines	Nulle	γ (7 S)
Electrophorèse sur papier Découpage - élution	Eluat de la zone β_2 γ_1	Présente	β_2A, β_2M (γ 19 S), γ (7 S)

L'action des agents physiques et chimiques précédents sur l'activité anti-Gm est résumée dans le tableau II.

TABLEAU II

ACTION D'AGENTS PHYSIQUES OU CHIMIQUES SUR L'ACTIVITÉ ANTI-Gm (anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x))

AGENT PHYSIQUE OU CHIMIQUE	ACTION SUR L'ACTIVITÉ ANTI-Gm
Chaleur	Thermostable à 56°C (pendant 30 mn) Thermolabile à 63°C (pendant 10 mn)
Variation du pH	Pas d'action entre pH 6,5 et pH 9
Dialyse contre une solution de ClNa à 9 p. 1000 (24 H. à 4° C)	Pas d'action (contrairement au facteur de Milgrom qui est détruit d'après BECK)
AGENTS SULFHYDRILES 1°) Chlorhydrate de cystéine 0,2M 2° Chlorhydrate de 2-mercaptoéthylamine 0,1M (technique de DEUTSCH et MORTON)	Destruction complète

C. Purification de l'activité anti-Gm(a) par chromatographie

Nous avons étudié par la méthode chromatographique la localisation de l'anti-Gm(a) d'un sérum normal, parallèlement à celle de l'anti-Gm(a) d'un sérum de P.C.E. contenant le Facteur Rhumatoïde. La nature macroglobulinique de ce dernier étant établie depuis les travaux de Kunkel et coll. (13), le fait de trouver l'activité anti-Gm(a) du sérum normal et le Facteur Rhumatoïde dans des fractions chromatographiques identiques serait en faveur d'une nature macroglobulinique de l'anti-Gm(a), sans toutefois en constituer une preuve absolue.

Nous avons ensuite soumis un sérum normal anti-Gm(a) à deux chromatographies successives sur deux échangeurs d'ions différents, afin d'obtenir une purification maxima du support de l'activité anti-Gma.

1) *Etude comparative de l'anti-Gma et du facteur rhumatoïde*

La technique chromatographique utilisant comme échangeur d'ions la diéthylaminoéthyl-cellulose (DEAE-cellulose) est la suivante :

Un volume de 6 ml de sérum anti-Gm(a) à fractionner (sérum de P.C.E. ou sérum de sujet normal) a été dialysé pendant 24 heures, à 4° C, contre de l'eau distillée tamponnée à pH 5,3. Le précipité d'euglobulines obtenu après centrifugation et lavage a été repris par du tampon phosphate disodique 0,01 M, pH 7,5. La solubilisation des euglobulines a été réalisée par addition de NaOH 0,01M jusqu'à obtention de pH 8,3. La DEAE-cellulose ayant été préalablement équilibrée contre un tampon phosphate disodique 0,01 M, pH 7,5, selon la méthode de Peterson et Sober (35), un volume de 6 ml d'euglobulines est traité par une quantité adéquate de DEAE-cellulose ne laissant que des γ-globulines dans le surnageant, conformément à la technique de Stanworth (47).

La DEAE-cellulose a alors été soumise successivement à quatre élutions par des tampons phosphate disodique de molarités croissantes et de pH décroissants (tableau III), selon une technique inspirée de celle de Lospalluto (27). Les volumes de tampon employés étaient égaux au volume de la solution initiale d'euglobuline. La DEAE-cellulose était essorée par centrifugation après chaque élution.

Dans le surnageant et les quatre éluats, nous avons mesuré le taux des protéines par absorption dans l'ultra-violet et recherché d'une part le Facteur Rhumatoïde (technique de Waaler-Rose modifiée, Chapitre VII), d'autre part l'activité anti-Gm(a). Les résultats observés sont rapportés dans le tableau III.

TABLEAU III

FRACTIONNEMENT PAR LA DEAE-CELLULOSE DES EUGLOBULINES D'UN SÉRUM DE P.C.E. PRÉSENTANT L'ACTIVITÉ ANTI-Gm(a)

Titre du Facteur Rhumatoïde : 1/128

Titre de l'activité anti-Gm(a) : 1/128

A. SURNAGEANT — constitué uniquement de gamma globulines 7S — dépourvu de toute activité agglutinante					
B. ELUATS	Molarité	pH	Taux de protéines en g/l	Titre du facteur rhumatoide	Titre anti-Gm(a)
N° 1	0,01	7,5	1	0	0
N° 2	0,025	7,5	0,7	0	0
N° 3	0,1	6	2	64	64
N° 4	0,15	5	0,3	0	0

C'est dans l'éluat n° 3, obtenu par le tampon phosphate disodique 0,1 M pH 6, contenant 2 g de protéines par litre, et seulement dans cette fraction, que nous avons retrouvé à la fois le Facteur Rhumatoïde (avec titre de 1/64) et l'activité anti-Gm(a) (avec un titre également de 1/64).

Nous avons alors appliqué la technique chromatographique précédente à un sérum normal anti-Gm(a). Là encore nous avons retrouvé l'activité anti-Gm(a) dans l'éluat obtenu par le tampon 0, 1 M pH 6, avec un titre voisin du titre initial du sérum normal anti-Gm(a) qui était de 1/32. Cette identité dans la localisation chromatographique est en faveur d'une nature macroglobulinique de l'anti-Gm(a) du sérum normal.

2) *Purification de l'anti-Gm(a) par chromatographies successives sur deux échangeurs d'ions.*

Nous caractériserons la purification du support de l'anti-Gm(a) par le rapport du titre de l'activité anti-Gm(a) au taux des protéines du sérum ou de la fraction sérique.

Le fractionnement par chromatographie sur DEAE-cellulose des euglobulines d'un sérum normal anti-Gm(a) nous a montré la possibilité de purifier l'anti-Gm(a). Nous avons employé également le fractionnement par chromatographie sur carboxyméthyl-cellulose (CM-Cellulose) selon la technique de Lospalluto (27) qui permet, elle aussi, de réaliser une purification de l'anti-Gm(a).

Afin d'obtenir un meilleur résultat, nous avons utilisé successivement, en partant d'une même préparation d'euglobulines, la chromatographie sur CM-cellulose et la chromatographie sur DEAE-cellulose : les fractions actives éluées de la CM-cellulose ont été à leur tour soumises à un second fractionnement à l'aide de la DEAE-cellulose. En associant ainsi les avantages d'un échangeur d'anions à un échangeur de cations, nous avons préparé une fraction sérique dont l'activité anti-Gm(a) (rapportée au taux de protéine) était 110 fois plus grande que dans le sérum initial anti-Gm(a).

Les modalités de dissolution des euglobulines et de leur adsorption sur les échangeurs d'ions, ainsi que les molarités et les pH des différents tampons phosphate d'élution sont exposés dans le tableau IV. Dans ce tableau sont également rapportés, pour chaque éluat, le taux de protéines et le titre anti-Gm(a), dont le rapport permet d'apprécier le degré de purification de l'anti-Gm(a).

La préparation d'anti-Gm(a) purifié contenait trop peu de protéines pour être examinée par ultracentrifugation analytique. Cette étude sera reprise en traitant par double chromatographie un volume important (plusieurs litres) de sérum anti-Gm(a) et en concentrant l'éluat actif obtenu.

TABLEAU IV

PURIFICATION PAR CHROMATOGRAPHIE D'UN SÉRUM ANTI-Gm(a)

(titre anti-Gm(a) du sérum : 1/32)

I. — CHROMATOGRAPHIE SUR CARBOXYMÉTHYL-CELLULOSE DES EUGLOBULINES

L'activité anti-Gm(a) des euglobulines (1 vol.) est adsorbée en « batch » à pH 5,3 par la carboxyméthyl-cellulose essorée (0,25 vol.); 0,5 vol. des tampons phosphate est utilisé pour chaque élution. La séparation est faite par centrifugation.

Eluat	Molarité	pH	Taux de protéines en g/l	Titre anti-Gm(a)	Taux de purification de l'anti-Gm(a) par rapport au sérum
N° 1	0,01	5,3	0,29	1/2	15
N° 2	0,056	6	0,24	0	
N° 3	0,075	6,5	0,66	1/16	53
N° 4	0,10	7	0,60	1/16	58

II. — CHROMATOGRAPHIE SUR DIÉTHYL-AMINOÉTHYL-CELLULOSE DES ÉLUATS N° 3 ET N° 4

Les éluats n° 3 et n° 4 sont dialysés à pH 5,3 (0,01 M phosphate). Les euglobulines précipitées sont solubilisées à pH 8,5 et adsorbées en « batch » à pH 7,5 par 0,25 vol. de diéthylaminoéthyl-cellulose essorée. 0,25 vol. des tampons phosphate est utilisé pour chaque élution.

Eluat	Molarité	pH	Taux de protéines en g/l	Titre anti-Gm(a)	Taux de purification de l'anti-Gm(a) par rapport au sérum
N° 1	0,01	7,5	0,13	0	
N° 2	0,025	7,5	0,16	0	
N° 3	0,050	7	0.13	0	
N° 4	0,075	6,5	0,08	0	
N° 5	0,10	6	0.08	1/4	110
N° 6	0,125	5,5	0,15	1/2	28
N° 7	0,15	5	0,10	0	

D. Étude de l'activité anti-Gm(a) par ultracentrifugation

L'action des agents sulfhydrilés sur l'activité anti-Gm(a) faisant présumer que cette activité est supportée par une macroglobuline, nous avons étudié la localisation de l'activité anti-Gm(a) par des méthodes d'ultracentrifugation. Les opérations d'ultracentrifugation ont été réalisées, sous la direction de M^me^ Filiti-Wurmser, par la Station centrale d'Ultracentrifugation du C.N.R.S. Dans un premier temps, une ultracentrifugation analytique a été réalisée sur une préparation d'euglobulines contenant l'activité anti-Gm(a). Dans un deuxième temps, une ultracentrifugation préparative a permis de réaliser une préparation de 19S dans laquelle l'activité anti-Gm(a) a été recherchée. Nous désignons par le terme 19S les constituants lourds du sérum.

1) *Ultracentrifugation analytique des euglobulines*

Des euglobulines ont été préparées par dialyse d'un sérum anti-Gm(a) contre un tampon acétate 0,01 M, pH 5,3, à 4° C pendant 24 heures. Le surnageant de la dialyse, après avoir été ramené à l'isotonie par addition de ClNa, se révélait totalement dépourvu d'activité anti-Gm(a). Le précipité d'euglobulines, lavé par le tampon 0,01 M, pH 5,3 a été dissous dans un volume de ClNa à 9 p. 1000 quatre fois plus faible que le volume de sérum soumis à la dialyse. Cette préparation d'euglobulines concentrée quatre fois par rapport au sérum présentait un titre anti-Gm(a) (1/64) qui était double du titre du sérum (1/32), alors que l'on aurait dû retrouver un titre anti-Gm(a) quatre fois supérieur au titre du sérum. Cette déperdition d'activité après dialyse paraît imputable à une altération de l'activité par le séjour de 24 heures à faible force ionique et à pH 5,3.

La préparation précédente d'euglobulines douées d'activité anti-Gm(a) a été soumise à une ultracentrifugation analytique (Fig. 3) qui a mis en évidence quatre constituants dont les coefficients de sédimentation et les pourcentages sont indiqués ci-dessous :

s_1 = 2,68 (2,66 à 20° C) (25 %)
s_2 = 5,96 (5,92 à 20° C) (62 %)
s_3 = 9,74 (9,70 à 20° C) (5 %)
s_4 = 15,80 (15,70 à 20° C) (8 %)

La présence de Macroglobulines dans la préparation d'euglobulines avait été vue par l'immunoélectrophorèse, méthode plus sensible que l'ultracentrifugation analytique. La préparation d'euglobulines, examinée par l'analyse immunoélectrophorétique (fig. 1, p. 66), présentait la ligne de précipitation correspondant à la β_2M, dont Filiti-Wurmser et coll. (7) ont montré la nature macroglobulinique. Par contre, cette préparation d'euglobuline, examinée à

l'aide du sérum 1299 et d'un sérum anti-α_2M préparé par Schultze, était dépourvue de l'α_2-Macroglobuline de Schultze, second constituant macroglobulinique du sérum (7), qui est connue pour être une pseudoglobuline. Schultze ayant démontré récemment que l'α_2M est le constituant majeur des macroglobulines, il n'est pas surprenant que l'ultracentrifugation analytique des euglobulines ne révèle qu'une quantité relativement faible de macroglobulines.

2) *Préparation de 19S par ultracentrifugation.*

Le sérum anti-Gm(a) a été soumis à une série de trois ultracentrifugations préparatives qui ont permis d'obtenir une préparation de 19S contenant environ 1 p. 100 de constituants non 19S. L'ultracentrifugation analytique de cette préparation (fig. 4) met en évidence un constituant principal dont le coefficient de sédimentation est :

$$s_1 = 14{,}95 \ (14{,}50 \text{ à } 20^\circ \text{ C})$$

et une série de constituants au pourcentage non calculable.

La teneur de cette préparation en 19 S était cinq fois plus grande que la teneur du sérum initial en 19 S. Le titre anti-Gm(a) de la préparation de 19 S était double (1/64) du titre initial du sérum anti-Gm(a) (1/32). Nous retrouvons dans cette préparation de 19 S la même déperdition d'activité anti-Gm(a) que dans la préparation d'euglobulines anti-Gm(a). Mais alors que nous avons constaté l'absence d'activité anti-Gm(a) dans la partie non euglobulinique du sérum, les opérations de dilutions réalisées au cours des ultracentrifugations préparatives n'ont pas permis de rechercher l'activité anti-Gm(a) dans la partie non 19 S du sérum.

E. Interprétation des résultats

L'activité anti-Gm, qu'elle soit anti-Gm(a), anti-Gm(b) ou anti-Gm(x), est présente dans les euglobulines obtenues par dialyse contre l'eau distillée à 4° C et tamponnée à pH 5,3, le surnageant de la précipitation, c'est-à-dire la partie du sérum non euglobulinique, étant totalement dépourvu d'activité. Ces euglobulines sont constituées essentiellement par des γ-globulines, la β_2M et laβ_1A. Les préparations de γ-globulines pures sont dénuées d'activité anti-Gm.

La destruction de l'activité par les agents sulfhydrilés est en faveur d'une nature macroglobulinique du support de cette activité. En effet, les agglutinines froides, l'anticorps hétérophile et le Facteur Rhumatoïde, qui sont de nature macroglobulinique, perdent leur activité sous l'action des agents sulfhydrilés ; de plus, les iso-agglutinines 19 S perdent leur activité sous l'action de ces agents alors que les iso-agglutinines 7S ne la perdent pas (13).

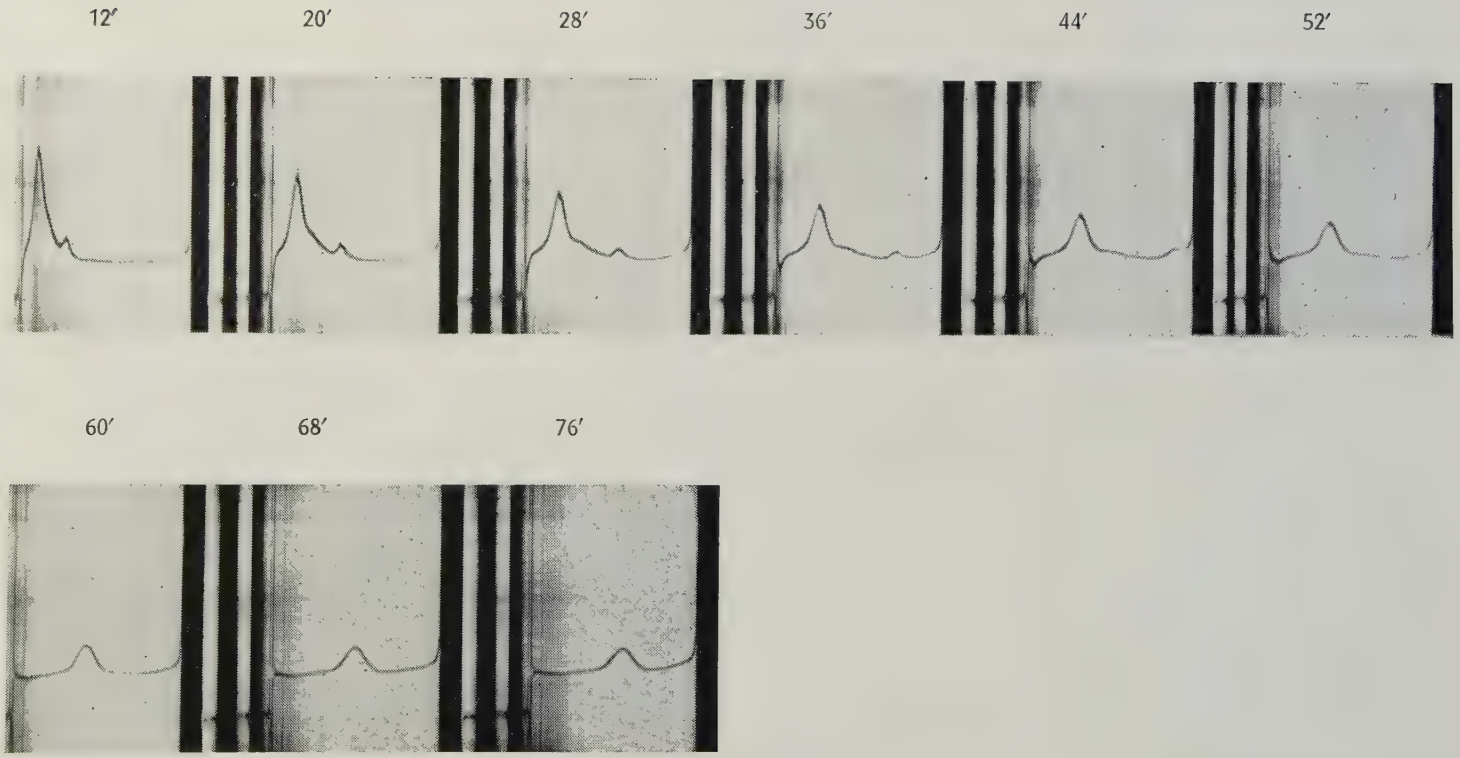


Fig. 3 — Ultracentrifugation analytique d'une préparation d'euglobulines anti-Gm (a) concentrée quatre fois.

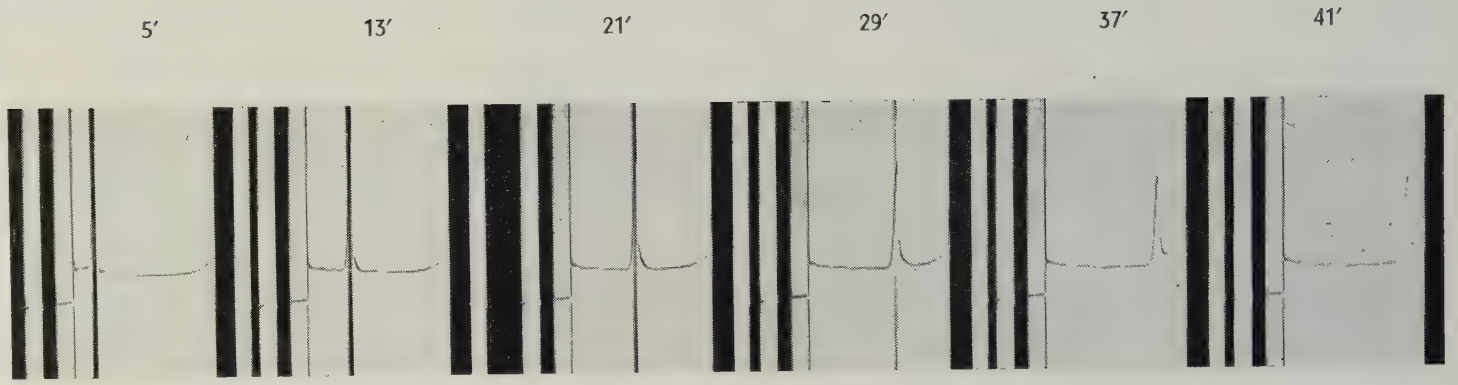


Fig. 4 — Ultracentrifugation analytique de la préparation de 19 S réalisée par ultracentrifugation préparative d'un sérum anti-Gma.

Les points communs que nous avons observés entre l'anti-Gm et le Facteur Rhumatoïde, à savoir la nature euglobulinique, la destruction par les agents sulfhydrilés, la localisation dans la même fraction chromatographique constituent des arguments en faveur d'une analogie chimique entre les supports de l'anti-Gm et du Facteur Rhumatoïde. Or, le Facteur Rhumatoïde est, d'après les travaux de Kunkel et coll. (26), une euglobuline 19 S, identifiée à la β_2M.

La nature macroglobulinique du support de l'activité anti-Gm a été confirmée, dans le cas de l'anti-Gm(a), par l'ultracentrifugation préparative d'un sérum anti-Gm(a). Les constituants de constante de sédimentation 19 S préparés à partir d'un tel sérum contenaient une partie notable de l'activité anti-Gm(a) du sérum. Les constituants 19 S du sérum sont la β_2M et l'α_2M (7). Nous avons constaté que les euglobulines douées d'activité anti-Gm étaient dépourvues d'α_2M. Il en résulte que le support de l'activité anti-Gm(a) ne peut être qu'une euglobuline β_2M (γ 19 S).

On peut admettre actuellement que la β_2M-globuline comprend toute une variété d'anticorps, probablement ceux qui ont une constante de sédimentation 19 S. Il n'y a donc pas une, mais toute une famille de β_2M-globulines ayant une même structure immunochimique de base, mais se diversifiant par leurs propriétés physiologiques. Cette famille peut être rangée, au même titre que les γ-globulines 7S, dans le groupe des immunoglobulines.

La β_2M-globuline présente dans certains états pathologiques une forte augmentation. Afin de savoir si une telle augmentation de la β_2M conditionnait l'apparition d'un pouvoir anti-Gm, nous avons examiné 33 sérums de macroglobulinémie de Waldenström, où le taux de la β_2M-globuline était de 20 à 30 g par litre de sérum. Aucun de ces sérums ne contenait une activité anti-Gm.

CHAPITRE IX

ÉTUDE IMMUNOLOGIQUE DE LA RÉACTION Gm/Anti-Gm

Le système Gm/anti-Gm, par la spécificité de l'agglutination et de l'inhibition de cette agglutination, évoque un système antigène-anticorps. Il est donc indiqué d'étudier le système Gm/anti-Gm par la méthode immunochimique de précipitation spécifique en milieu gélifié, qui a permis à Oudin (32) de décrire la spécificité allotypique des γ-globulines du lapin.

Il est permis de se demander si les injections répétées de sérums Gm(+) à des sujets Gm(—) ne vont pas déterminer chez ces derniers, par immunisation, l'apparition d'un anticorps anti-Gm dirigé contre un facteur Gm dont ils sont dépourvus. Il faut rappeler à ce propos que tous les sérums anti-Gm sont dépourvus du facteur qu'ils permettent de déceler. Pour répondre à cette question, nous avons recherché la présence de l'activité anti-Gm dans le sérum de sujets polytransfusés.

Enfin, nous avons fait agir sur un sérum anti-Gm(a) des γ-globulines Gm(a+) chimiquement combinées à un support cellulosique, afin de retirer sélectivement l'activité anti-Gm(a) de ce sérum et de montrer par là l'existence d'une union entre l'anti-Gm(a) et les γ-globulines Gm(a+).

Étude du système Gm/anti-Gm par la réaction de précipitation en gel

Nous avons utilisé la réaction de précipitation en gel de gélose avec double diffusion selon la méthode d'Ouchterlony (31), pour rechercher si le sérum anti-Gm(a) de sujets normaux présentait une ligne de précipitation avec un sérum de facteur Gm(a+).

Le sérum anti-Gm(a) étant agglutinant jusqu'à la dilution 1/32 et le sérum Gm(a+) étant inhibiteur de l'agglutination jusqu'à la dilution de 1/128, nous avons fait varier les dilutions des deux sérums en présence dans les limites de leurs activités respectives. En aucun cas, nous n'avons obtenu de ligne de précipitation. Le

même phénomène a été observé avec les sérums anti-Gm(b) et anti-Gm(x) mis en présence de sérums présentant les facteurs Gm(b+) et Gm(x+).

Nous avons procédé à la même expérience de double diffusion en faisant diffuser non plus des sérums mais des réactifs purifiés. Le sérum anti-Gm(a) était remplacé par une préparation de 19 S obtenue par ultracentrifugation préparative et contenant l'activité anti-Gm(a). Le sérum Gm(a+) était remplacé par une préparation de γ-globulines Gm(a+) pures, obtenues par la méthode de Stanworth (47) et dont la pureté avait été vérifiée par immuno-électrophorèse. La figure 1 montre que les deux préparations, γ-globulines Gm(a+) et 19 S anti-Gm(a), correctement révélées par un anti-sérum humain, ne donnent lieu à aucune ligne de précipitation entre elles.

Le système Gm/anti-Gm se distingue de l'allotypie décrite par Oudin chez le lapin et des groupes d'Allison chez l'homme par l'absence de réaction de précipitation visible en milieu gélifié.

Recherche d'une immunisation anti-Gm chez les sujets polytransfusés

Pour rechercher si l'injection répétée de sérum Gm(+) à des sujets Gm(—) ne déterminait pas chez ces derniers, par immunisation, l'apparition d'un facteur anti-Gm, nous avons examiné trente sérums de malades adultes ayant reçu un nombre de transfusions variant de 20 à 40 et qui montraient une répartition normale des divers phénotypes, c'est-à-dire comportaient des facteurs Gm(a—), Gm(b—) et Gm(x—). Rappelons que les sujets présentant les trois facteurs, c'est-à-dire ayant le phénotype Gm(a+b+x+), ne représentent que 11,92 p. 100 de la population. Le tiers environ des sérums examinés agglutinait les globules rouges sensibilisés, mais à un taux de dilution très faible (titre 1/1 ou 1/2) rendant très délicate la recherche de l'inhibition spécifique qui permet d'authentifier le caractère anti-Gm du sérum examiné. Parmi les sérums agglutinants précédents, celui qui par son pouvoir agglutinant le plus net (titre voisin de 1/4) se prêtait à une recherche correcte de l'inhibition spécifique, s'est révélé doué d'activité anti-Gm(a). L'expérience acquise au cours de la recherche du pouvoir anti-Gm sur 13.000 sérums normaux nous permet de présumer que parmi les sérums agglutinants de polytransfusés figure un certain nombre de sérums anti-Gm que nous sommes dans l'impossibilité d'authentifier en raison de leur faible titre agglutinant. Les résultats précédents sont en faveur d'une nature anticorps de l'anti-Gm.

Récemment, Allen et Kunkel, reprenant l'étude précédente sur des sérums non plus d'adultes polytransfusés, mais d'enfants polytransfusés, ont pu constater la nature anticorps de l'anti-Gm.

Une remarque s'impose : les transfusions répétées étant nécessitées par un état pathologique, l'anti-Gm détecté chez les polytransfusés n'est plus l'anti-Gm du sérum normal.

FIGURE I

Examen en double diffusion, selon la technique d'Ouchterlony, des préparations de 19 S anti-Gm(a) et de γ-globulines Gm(a+), ces deux préparations étant révélées à l'aide d'un anti-sérum humain total (A.S.H.) placé dans le réservoir central.

Utilisation de gamma-globulines Gm(a+) combinées à un support cellulosique

Les facteurs Gm étant localisés dans les γ-globulines 7 S du sérum, des préparations de γ-globulines 7 S, dont la pureté a été vérifiée par immunoélectrophorèse, ont été obtenues par la méthode de Stanworth (44) à partir d'un sérum Gm(a+) d'une part, à partir d'un sérum Gm(a—) d'autre part. Les γ-globulines 7 S Gm(a+) avaient conservé le pouvoir inhibiteur qu'elles présentaient dans le sérum, et les γ-globulines 7 S Gm(a—) étaient toujours dépourvues de pouvoir inhibiteur. Les γ-globulines appartenant à chacun des types Gm(a) ont été combinées à de la paraaminobenzyl-cellulose diazotée, l'avantage de cette combinaison étant de pouvoir séparer le support cellulosique, donc les γ-globulines, par centrifugation à partir du milieu sérique (sérum anti-Gm(a)) auquel cette combinaison sera ajoutée.

a) *Préparation de la combinaison PAB-cellulose/γ-globuline.*

La paraaminobenzyl-cellulose (PAB-cellulose) est diazotée de la façon suivante : 2,5 g de PAB-cellulose sèche préalablement lavés par PO_4Na_2H 0,1 M sont remis en suspension dans 90 ml de HCl N. On leur ajoute goutte à goutte 0,25 ml de NO_2Na à 10 p. 100 en contrôlant avec du papier amido-ioduré. Après lavage avec successivement 125 ml de CH_3COONa à 5 p. 100, 125 ml d'urée à 5 p. 100 et 125 ml d'eau, la PAB diazotée est mise en suspension dans du ClNa à 9 p. 1.000. Toutes les opérations précédentes ont été effectuées à une température voisine de 0°.

La PAB-cellulose diazotée est alors combinée aux γ-globulines. La PAB-cellulose diazotée est mise en suspension dans 25 ml de PO_4Na_2H 0,1 M à 4°. Le pH initial de 7,9 est porté à 8,9 par addition de NaOH N. On ajoute 3 ml de γ-globulines à 7,2 g/l et on soumet à l'agitation pendant trente minutes à 4°.

Le produit est lavé par PO_4Na_2H 0,1 M (600 ml), par NaCl à 5 % (600 ml) et enfin par NaCl à 9 p. 1.000. On s'assure de la combinaison de la γ-globuline au support cellulosique en faisant passer un anti-sérum humain sur une colonne constituée par le produit ainsi préparé. L'immuno-électrophorèse de l'anti-sérum humain passé sur la colonne précédente montre la disparition des anticorps anti-γ-globulines.

b) *Action de la γ-globuline combinée au support cellulosique sur un sérum anti-Gm(a).*

Les combinaisons précédentes de γ-globulines d'une part Gm(a+), d'autre part Gm(a—), sont mises en contact avec un sérum anti-Gm(a) (10 volumes de sérum anti-Gm(a) pour un volume de combinaison γ-globuline/support cellulosique centrifugé). Après quinze minutes d'agitation du mélange, la combinaison γ-globuline/support cellulosique est facilement séparée du sérum anti-Gm(a) par centrifugation en raison de la taille et de la densité des particules cellulosiques. L'activité anti-Gm(a) est alors recherchée dans les deux échantillons de sérum anti-Gm(a) ainsi traités.

Le sérum anti-Gm(a) traité par les γ-globulines Gm(a+) combinées a perdu toute activité anti-Gm(a), alors que le sérum anti-Gm(a) traité par les γ-globulines Gm(a—) combinées a conservé la totalité de son activité anti-Gm(a). La combinaison PAB-cellulose/γ-globuline Gm(a+) permet donc de fixer et de retirer sélectivement l'activité anti-Gm(a) d'un sérum anti-Gm(a). Il s'agit bien d'une réaction spécifique et non d'une réaction analogue à la fixation du Facteur Rhumatoïde sur des γ-globulines agrégées par chauffage, car la combinaison PAB-cellulose/γ-globuline Gm(a—) n'a aucune action sur l'activité d'un sérum anti-Gm(a). Nous nous étions assurés que la PAB-cellulose seule était sans action sur l'activité anti-Gm(a). L'existence d'une union entre l'anti-Gm(a) et les γ-globulines Gm(a+) au cours de leur interaction se trouve ainsi démontrée.

La technique précédente, qui permet de fixer sélectivement l'anti-Gm(a) sur un support cellulosique par l'intermédiaire des γ-globulines Gm(a+), est susceptible de faire progresser nos connaissances sur la nature chimique et immunochimique de l'anti-Gm(a) ; deux types d'expérience peuvent être envisagées, d'une part l'élution de l'anti-Gm(a) à partir du complexe, d'autre part l'absorption d'un anti-sérum humain par ce complexe. Nous avons essayé d'éluer le support de l'activité anti-Gm(a) à partir du complexe précédent par les procédés qui ont permis à certains auteurs d'éluer certains anticorps à partir du complexe anticorps/antigène/support cellulosique. Mais le pH acide de 3,3 utilisé dans ces procédés d'élution a la propriété de détruire l'activité anti-Gm(a).D'autres procédés d'élution par l'urée 6 M, les sels ou les sucres à la concentration de 15 p. 100, n'ont pas donné de résultats.

Par contre, l'absorption d'un antisérum humain à l'aide du complexe comprenant l'anti-Gm(a) nous a permis de confirmer la nature β_2-Macroglobulinique de l'anti-Gm(a). L'analyse immunoélectrophorétique d'un anti-sérum humain total absorbé par la combinaison γ-globuline Gm(a+)/PAB-cellulose montre la disparition prévisible des anticorps anti-γ-globulines 7 S. L'analyse immunoélectrophorétique du même antisérum humain total absorbé par la combinaison précédente ayant fixé l'anti-Gm(a), montre la persistance des anticorps anti-γ-globulines 7 S et la disparition des anticorps anti-β_2M (anti-γ_1 19 S).

Ceci indique que les γ-globulines 7 S Gm(a+) ont été recouvertes par l'anti-Gm(a) et que celui-ci, se trouvant à leur surface, a absorbé l'anticorps anti-β_2M.

Dans l'expérience précédente, nous avions pris les précautions suivantes : après avoir mis en contact la combinaison γ-globuline

Gm(a+)/PAB-cellulose au contact d'un excès de sérum anti-Gm(a), nous avions pris soin d'éliminer par lavage du complexe toute trace de sérum avant l'absorption de l'anti-sérum humain total par le complexe contenant l'anti-Gm(a). Les deux échantillons d'anti-sérum humain total différemment absorbés avaient été ramenés à la concentration protéique initiale de l'antisérum humain total et examinés en immunoélectrophorèse à l'aide d'un même sérum humain normal.

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS

Grubb a mis en évidence, en 1956, des différences de groupes sériques entre les γ-globulines humaines par une réaction immunologique d'inhibition de l'agglutination. Les facteurs de groupes sériques Gm(a), Gm(b) et Gm(x), présentant des relations entre eux, sont localisés dans les γ-globulines sériques et héréditairement transmis. Ces groupes sériques du système Gm (Gm étant l'abréviation de γ-globulines) ne présentent aucune relation avec les groupes érythrocytaires et les groupes d'haptoglobine.

PREMIERE PARTIE

Étude sérologique des groupes sériques Gm

1) *Méthode de détermination des groupes sériques Gm.*

Certains sérums de sujets normaux ont la propriété d'agglutiner les globules rouges humains de groupe O Rh+ sensibilisés par certains anticorps anti-Rh (anti-D) incomplets. L'inhibition de cette agglutination par un sérum traduit le caractère Gm(+) de ce sérum, sa non inhibition traduit le caractère Gm(—) de ce sérum ; le complexe sérum anti-Gm/sérum anti-D varie suivant que la détermination porte sur le facteur Gm(a), le facteur Gm(b) ou le facteur Gm(x).

2) *Recherche systématique des sérums réactifs nécessaires à la détermination des groupes sériques Gm.*

L'examen de 13.000 sérums de sujets normaux nous a permis de détecter 18 sérums anti-Gm(a), 9 anti-Gm(b), 2 anti-Gm(x). Sur 124 sérums anti-Rh (anti-D) examinés nous en avons trouvé 19 qui convenaient pour la recherche du facteur Gm(a), 10 pour le Gm(b) et 9 pour le Gm(x).

3) *Détermination des groupes sériques dans différentes races humaines.*

Nous avons déterminé les trois facteurs Gm sur les sérums de 705 Blancs (de la région parisienne), de 400 Noirs (de Dakar), de 250 Chinois (de Macao) et 100 Indiens (Oulouyennes de la Guyane).

La variabilité de la répartition des facteurs Gm suivant la population envisagée constitue un apport valable pour la différenciation des différentes races humaines. La population blanche présente environ 50 % de Gm(a+), 90 % de Gm(b+) et 17 % de Gm(x+). Les Noirs présentent 100 % de Gm(a+) et de Gm(b+), mais sont dépourvus du facteur Gm(x). Les Chinois et les Indiens sont 100 % Gm(a+), mais ne sont pas dépourvus du facteur Gm(x).

La répartition observée des phénotypes Gm, c'est-à-dire l'association des trois facteurs chez un même individu, Gm(a+b+x+), Gm(a+b+x—), etc. est en accord avec l'existence, chez les Blancs, de 3 gènes allélomorphes Gm^a, Gm^{ax} et Gm^b (la comparaison de la fréquence des phénotypes observés à la fréquence calculée donne $\chi^2 = 0{,}237$, $P > 0{,}90$). La comparaison de la répartition des phénotypes de 705 Blancs de la région parisienne à celle obtenue par Steinberg sur 303 blancs des U.S.A. montre une compatibilité parfaite (Test de Fisher, $\chi^2 = 1{,}355$, $0{,}80 < p < 0{,}90$.

La constance de la propriété Gm(a+) chez les Noirs ne peut pas être rapportée à l'augmentation du taux des γ-globulines de leur sérum (1,8 fois supérieur à celui des Blancs).

4) *Méthodes d'évaluation des γ-globulines sériques.*

Les groupes sériques Gm ont été étudiés sur des sérums présentant des variations importantes et pathologiques du taux des γ-globulines.

Le taux des γ-globulines sériques a été évalué par électrophorèse sur papier, en gel de gelose et en gel d'amidon ainsi que par une méthode immunologique plus précise, que nous avons mise au point, basée sur la « réaction d'inhibition de l'antiglobuline ». Un immunsérum animal anti-globuline humaine agglutine les globules rouges ayant fixé un anticorps incomplet (ici un anticorps anti-Rh) de nature globulinique. Cette agglutination est inhibée par la γ-globuline humaine. Cette réaction a été étalonnée sur des sérums normaux, et sa spécificité vérifiée à l'aide de protéines sériques isolées. Des sérums de sujets « agammaglobulinémiques », se présentant à l'électrophorèse et à l'analyse immunoélectrophorétique comme totalement privés de γ-globulines, se montrent cependant inhibiteurs de l'antiglobuline à des taux de dilution très bas, qui traduisent des quantités de 0,01 à 0,02 g p. 100 de γ-globulines.

5) *Groupes sériques Gm et variations du taux des γ-globulines.*

La répartition des phénotypes Gm dans 79 sérums de myélomes ne se distingue de celle de 705 sérums normaux que par une

seule mais très importante différence, qui est l'existence de 5 sérums de myélomes où aucun facteur Gm n'a pu être mis en évidence, et auxquels on pouvait donc attribuer le phénotype apparent Gm(a—b—x—), pas toujours explicable par une disparition partielle ou quasi-totale des γ-globulines. Deux sérums de sujets « agammaglobulinémiques », ne contenant que 0,01 et 0,02 g p. 100 de γ-globulines, apparaissaient également Gm(a—b—x—).

La constatation de la présence des caractères Gm(a—), Gm(b—) ou Gm(x—) dans l'hypergammaglobulinémie (9 sérums de cirrhotiques) montre que celle-ci n'agit pas sur le caractère Gm(—).

DEUXIEME PARTIE

Etude physico-chimique de l'activité anti-Gm des sérums normaux

1) *Etude des sérums normaux anti-Gm*

L'activité anti-Gm est rencontrée rarement parmi les sérums de sujets normaux (1 sérum anti-Gm(a) sur 600, 1 sérum anti-Gm(b) sur 1.000 et 1 sérum anti-Gm(x) sur 6.000). Nous avons particulièrement étudié 12 de ces sérums anti-Gm. Ces sérums étaient dépourvus du Facteur Rhumatoïde hémagglutinant et ne présentaient aucune anomalie des protéines examinées par l'électrophorèse sur papier, sur gel d'amidon et par l'analyse immuno-électrophorétique.

2) *Etude physico-chimique de l'activité anti-Gm*

Les résultats obtenus ont été identiques pour les trois activités anti-Gm (anti-Gm(a), anti-Gm(b) et anti-Gm(x)). L'activité anti-Gm est présente dans les euglobulines obtenues par dialyse du sérum à 4° C et à pH 5,3, ainsi que dans les globulines précipitant par le sulfate d'ammonium à 33 p. 100 de saturation. L'analyse immuno-électrophorétique de ces euglobulines montre essentiellement des γ-globulines, la β_2-Macroglobuline (γ 19 S) et la β_1A-globuline.

L'activité anti-Gm est absente des γ-globulines immuno-électrophorétiquement pures préparées par la méthode chromatographique de Stanworth ou par précipitation par l'héparine en présence de chlorure de cobalt selon la méthode de Burstein. Par la méthode d'électrophorèse sur papier suivie de découpage-élution, elle se trouve dans l'éluat de la zone β_2 γ_1 contenant la β_2A, la β_2M et les γ 7S.

L'activité anti-Gm est thermostable à 56° C, thermolabile par chauffage pendant 10 mn à 63° C.Elle n'est pas modifiée par les

variations de pH entre pH 6,5 et pH 9. La destruction par les agents sulfhydrilés, et la localisation dans la même fraction chromatographique que le Facteur Rhumatoïde sont en faveur d'une nature macroglobulinique du support de l'activité anti-Gm. L'activité anti-Gm(a) a été trouvée dans la fraction 19 S obtenue par ultracentrifugation préparative d'un sérum anti-Gm(a). Le support de l'activité anti-Gm(a) a été purifié 110 fois par chromatographies successives sur carboxymethyl-cellulose et diéthylaminoethyl-cellulose. La β_2 Macroglobuline (γ-globuline 19 S) apparaît donc comme le support de l'activité anti-Gm du sérum normal.

3) *Etude immunologique du système Gm/anti-Gm.*

Le système Gm/anti-Gm ne donne pas lieu à une réaction de précipitation en milieu gélifié, contrairement à l'allotypie décrite par Oudin.

L'examen de 30 sérums de polytransfusés a donné des résultats en faveur d'une nature anticorps de l'anti-Gm.

Enfin, une union entre l'anti-Gm(a) et la γ-globuline Gm(a+) au cours de leur interréaction a été démontrée à l'aide de γ-globulines Gm(a+) combinées par diazotation à un support cellulosique.

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE

1. — ALLISON (A. C.) et BLUMBERG (B. S.). — An isoprecipitation reaction distinguishing human serum protein types (*Lancet, 1961,* 1, *634*).

2. — BECK (J. S.). — Some properties of human anti-antibody (*British J. Exper. Pathology, 1961,* 42, *7*).

3. — BOYER (S.) et MILCH (R.). — A new determinant Gm^{ab} in coloured populations *(Am. Soc. Hum. Genet. Abstracts, 1960).*

4. — BRONNESTAM (R.) et NILSSON (S. B.). — Gamma globulin groups (Gm) of mothers and their newborn infants *(Vox Sanguinis, 1957,* 2, *316).*

5. — BURSTEIN (M.) et PRAWERNAN (A.). — Dosage turbidimétrique des γ-globulines après précipitation par l'héparine en présence de chlorure de cobalt *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1959,* 4, *918).*

6. — DEUTSCH (H. F.) et MORTON (A.). — Dissociation of the human serum macroglobulin *(Science, 1957,* 125, *600).*

7. — FILITI-WURMSER (S.), HUGON (M. P.) et HARTMANN (L.). — Identification immuno-électrophorétique des constituants du sérum normal *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1958,* 3, *1080).*

8. — FINE (J.-M.) et CREYSSEL (R.). — Contribution à l'étude immuno-chimique des globulines anormales du sérum au cours du myélome *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1961,* 6, *766).*

9. — FINE (J.-M.), GROULADE (J.), SAINT-PAUL (M.) et TIZZANI (R.-J.). — L'électrophorèse sur papier *(Biologie Médicale, 1956,* 45, *591).*

10. — FINE (J.-M.) et LOEB (J.). — Electrophorèse sur gel d'amidon II. Protéines et lipoprotéines du sérum humain *(Revue d'Hématologie, 1958,* 13, *449).*

11. — FINE (J.-M.), WASZCZENKO (E.), LOEB (J.) et MOULLEC (J.). — Groupes sériques et électrophorèse sur gel d'amidon I. Modifications techniques *(Revue d'Hématologie, 1957,* 12, *698).*

12. — FISHER (R. A.). — Statistic Method for research works *(Oliver and Boyd, Edinburgh, 1957, p. 79).*

13. — FUDENBERG (H.), HUNKEL (H. G.) et FRANKLIN (E. C.). — High molecular weight antibodies *(Proceedings of the seventh International Congress of Society of Blood Transfusion, 1959, Karger éd. Basel, p. 522).*

14. — GRABAR (P.) et BURTIN (P.). — Analyse immunoélectrophorétique. Ses applications aux liquides biologiques humains *(1960, Paris, Masson, éditeur).*

15. — GRABAR (P.) et WILLIAMS (C. A.). — Méthodes permettant l'étude conjuguée des propriétés électrophorétiques et immunochimiques d'un mélange de protéines *(Biochem. Biophys. Acta, 1963,* 10, *193 ; 1955,* 17, *67).*

16. — GRASSMAN (W.), HANNIG (K.) et KNEDEL (M.). — Über die Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier *(Dtsch. med. Wschr., 1951,* 26, *333).*

17. — GRUBB (R.). — « A method of demonstrating minute amounts of human γ-globulin » *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1956, 38, 339).*

18. — GRUBB (R.). — Agglutination of erythrocytes coated with « incomplete » anti-Rh by certain rheumatoid arthritic sera and some other sera. The existence of human serum groups *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1956, 39, 195).*

19. — GRUBB (R.). — Hereditary gamma-globulin groups in man *(Ciba Foundation Symposium on Biochemistry of human Genetics. J. and A. Churchill, 1959, p. 264).*

20. — GRUBB (R.) et LAURELL (A. B.). — Hereditary serological human serum groups *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1956, 39, 390).*

21. — GRUBB (R.). — A relationship between blood group serology and rheumatoid arthritis serology. Serum protein groups *(Vox Sanguinis, 1957, 2, 305).*

22. — HARBOE (M.). — A new hemagglutinating substance in the Gm system anti-Gmb *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1959, 47, 191).*

23. — HARBOE (M.). — A new type in the Gm system *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1959, 45, 357).*

24. — HARBOE (M.). — Relation between Gm types and hemagglutinating substances in rheumatoid sera *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1960, 50, 89).*

25. — HARBOE (M.). — Interaction between red cells coated with incomplete anti-D and rheumatoid sera *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1960, 50, 383).*

26. — KUNKEL (H. G.), FRANKLIN (E. C.) et MULLER-EBERHARD (H. J.). — Studies on the isolation and characterization of the rhumatoid factor *(J. Clin. Invest., 1959, 38, 424).*

27. — LOSPALLUTTO (J.), CHEGORIANSKY (J.), LEWIS (A.) et ZIFF (M.). — Chromatographic properties of gamma-globulin : behavior of serum gamma-macroglobulins *(J. Clin. Invest., 1960, 39, 473).*

28. — MATTE (C.), MOULLEC (J.) et AUDRAN (R.). — Recherche des sérums anti-Gm chez les sujets normaux *(Transfusion, 1961, 4, 39).*

29. — MILGROM (F.), DUBISKI (S.) et WORNICZKO (G.). — Human sera with « anti-antibody » *(Vox Sanguinis, 1956, 1, 172).*

30. — MOULLEC (J.), KHERUMIAN (R.), SUTTON (E.) et ESPAGNON (P.). — Contribution à l'étude du facteur de groupe Gm(a) du plasma humain *(Revue d'Hématologie, 1956, 11, 512).*

31. — OUCHTERLONY (O.). — Antigen-antibody reactions in gel *(Acta Path. Microb. Scandinav., 1949, 26, 507).*

32. — OUDIN (J.). — L'analyse immunochimique par la méthode des gels. Moyens et technique d'identification des antigènes *(Ann. Inst. Pasteur, 1955, 89, 531).*

33. — OUDIN (J.). — L'allotypie de certains antigènes protéidiques du sérum. Relations immunochimiques et génétiques entre six des principaux allotypes observés dans le sérum de lapin *(C. R. Acad. Sci., 1960, 250, 770).*

34. — PETERSON (E. A. and SOBER (A.). — Chromatography of proteins *(J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 751).*

35. — PETERSON (E. A.) et SOBER (H. A.). — Chromatography of proteins 1) Cellulose ion-exchange adsorbents *(J. Amer. Chem. Soc., 1956, 78, 756).*

36. — PODLIACHOUK (L.), EYQUEM (A.) et JACQUELINE (F.). — Le diagnostic de la P.C.E. par agglutination des globules rouges humains sensibilisés *(Ann. Inst. Pasteur, 1958, 94, 659).*

37. — ROPARTZ (C.), LENOIR (J.), HUREL (R.), HEMET (Y.) et BRETEAU (G.). — Les antiglobulines humaines présentes dans les sérums de sujets normaux. I. Détection et différenciation *(Revue d'Hématologie, 1958, 13, 511).*

38. — ROPARTZ (C.) et LENOIR (J.). — Les antiglobulines humaines présentes dans les sérums de sujets normaux. II. Fréquence et caractéristiques sérologiques *(Revue d'Hématologie, 1960, 15, 40).*

39. — ROPARTZ (C.) et LENOIR (J.). — Propriétés inhibitrices héréditaires des sérums humains *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1960, 5, 75).*

40. — ROPARTZ (C.), LENOIR (J.) et RIVAT (L.). — Identité du facteur Gm(a) et de la propriété inhibitrice In A (+) *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1960, 5, 79).*

41. — ROPARTZ (C.), RIVAT (L.) et LENOIR (J.). — Identité du facteur Gm(x) et de la propriété inhibitrice In b(+) *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1960, 5, 604).*

42. — ROPARTZ (C.), RIVAT (L.) et LENOIR (J.). — Fréquence des facteurs Gm(a), Gm(b), Gm-like et Inv chez 400 Noirs africains *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1960, 5, 814).*

43. — ROPARTZ (C.), ROUSSEAU (P. Y.), HEMET (Y.) et RIVAT (L.). — About the possible origins of the anti-Gm sera *(Nature, 1960, 188, 1120).*

44. — ROPARTZ (C.), ROUSSEAU (P. Y.) et LENOIR (J.). — Le système de γ-globulines dans une population de la Seine-Maritime *(Rev. Franç. d'Etudes Clin. et Biol., 1962, 7, 847).*

45. — SCHEIDDEGGER (J.-J.). — Une microméthode de l'Immuno-électrophorèse *(Intern. Arch. Allergy, 1955, 7, 103).*

46. — SMITHIES (O.). — Zone electrophoresis in starch gels *(Biochem. J., 1955, 61, 129).*

47. — STANWORTH (D. R.). — A rapid method of preparing pure serum gamma globulins *(Nature, 1960, 188, 156).*

48. — STEINBERG (G.). — Hereditary Globulin Factors and Immune Tolerance in Man *(Science, 1963, 140, 303).*

49. — STEINBERG (G.), STAUFFER (R.) et FUDENBERG (H.). — Distribution of (Gm(a) and Gm-like among Javanese, Djuka Negroes, and Oyana, and Carib Indians *(Nature, 1960, 185, 324).*

50. — STEINBERG (G.), STAUFFER (R.) et BOYER (S.). — Evidence for Gm^{ab} allele in the Gm system of American Negroes *(Nature, 1960, 188, 169).*

51. — STEINBERG (G.), STAUFFER (R.), BLUMBERG (B.) et FUDENBERG (H.). — Gm phenotypes and genotypes in U.S. Whites and Negroes in American Indians ans Eskimos, in Africans, and in Micronesians *(Amer. J. Hum. Genet., 1961,* 13, *205).*

52. — TULLIS (J. L.), KETCHEL (M. M.), PYLE (M. P.), PENNELL (R. B.), GIBSON (J. G.) et TUICH (R. J.). — Studies on the in vivo survival of glycerolyzed and frozen human red blood cells *(J.A.M.A., 1958,* 168, *399).*

53. — UNGER (L. J.), WIENER (A. S.) et KATZ (L.). — Studies of an antibody-like substance in certain human serum, causing agglutination of red cells coated with Rh antibody *(Amer. J. Clin. Pathol., 1958,* 29, *113).*

54. — VAUGHAN (J. H.) et GOOD (R. A.). — Relation of agamma-globulinemia sera to rheumatoid agglutination reactions *(Arthritis and Rheumatism, 1958,* 1, *99).*

55. — WIENER (A. S.). — Serologic test for human γ-globulin. Application in diagnosis and treatment of agammaglobulinemia *(Amer. J. Clin. Pathol., 1955,* 25, *595).*

56. — WIENER (A. S.), HYMAN (M. A.) et HANDMAN (L.). — « A new serological test (Inhibition test) for human serum globulin » *(Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 1949,* 71, *96).*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION 1

PLAN 4

PREMIÈRE PARTIE

ÉTUDE SÉROLOGIQUE DES GROUPES SÉRIQUES Gm

CHAPITRE I. — **Méthode de détermination des groupes sériques Gm** 9
Principe de la réaction 9
Le complexe agglutinable 10
L'agglutination par les sérums anti-Gm 13
La réaction d'inhibition 15

CHAPITRE II. — **Recherche systématique des sérums réactifs nécessaires à la détermination des groupes sériques Gm** 20
Les sérums réactifs de référence 21
Détection des sérums anti-Gm 21
Détection des sérums anti-D 23

CHAPITRE III. — **Détermination des groupes sériques Gm dans différentes races humaines** 25
Technique sommaire de détermination 25
Résultats des déterminations 26
Etude statistique des résultats 27
a) race blanche 27
b) autres races 30
Etude du mécanisme d'action des gènes sur les facteurs Gm . 33

CHAPITRE IV. — **Méthode d'évaluation des γ-globulines sériques** 36
1) Méthodes électrophorétiques 36
2) Méthode immunologique 38
Matériel et technique 39
Application à des sérums pathologiques 40
3) Valeurs comparées des méthodes 41

CHAPITRE V. — **Groupes sériques Gm et variation du taux des γ-globulines** 44
I. Groupes Gm dans les hypo-gamma-globulinémies 44
a) Myélome 44
b) Leucémies 48
II. Groupes Gm dans les hyper-gamma globulinémies 49

DEUXIÈME PARTIE

ÉTUDE DES SÉRUMS NORMAUX ANTI-Gm

ET DE LEUR ACTIVITÉ ANTI-Gm

CHAPITRE VI. — **Méthodes d'étude et de fractionnement du sérum** .. 53
I. Méthodes de précipitation chimique 53
II. Méthode chromatographique 54
III. Méthodes électrophorétiques 55
IV. Analyse immunoélectrophorétique 55
V. Méthode d'électrophorèse-élution 56

CHAPITRE VII. — **Etude des sérums normaux anti-Gm** 57
Mise en évidence de l'anti-Gm des sérums normaux 57
Avantage de l'anti-Gm du sérum normal 58
Détection des sérums normaux anti-Gm 58
Etude de 12 sérums anti-Gm 59
A) Etude sérologique 59
B) Etude biochimique 61

CHAPITRE VIII. — **Etude physico-chimique de l'activité anti-Gm** 65
A) Localisation biochimique de l'anti-Gm 65
B) Action d'agents physiques ou chimiques sur l'activité anti-Gm 68
C) Purification de l'activité anti-Gm(a) par chromatographie .. 70
D) Etude de l'activité anti-Gm(a) par ultracentrifugation 74
E) Interprétation des résultats 75

CHAPITRE IX. — **Etude immunologique de la réactio Gm/anti-Gm** 79
Etude du système Gm/anti-Gm par la réaction de précipitation en gel 79
Recherche d'une immunisation anti-Gm chez les sujets polytransfusés 80
Utilisation de γ-globulines Gm(a+) combinées à un support cellulosique 82

RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS 85

INDEX BIBLIOGRAPHIQUE 89

TABLE DES MATIÈRES 93

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

"Les Systèmes de groupes sériques humains"

Vu et approuvé :

Paris, le 20 Septembre 1963

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

MARC ZAMANSKY

VU
et permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,

JEAN ROCHE